

TESIS DE DOCTORADO

**ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LOS
PUENTES DISULFURO EXTRACELULARES
DEL RECEPTOR 5-HT_{2A} HOMODIMÉRICO
EN LA FARMACOLOGÍA ANTIPSICÓTICA**

Marta Cimadevila Fondevila

**ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN Y
DESARROLLO DE MEDICAMENTOS**

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2019



DECLARACIÓN DE LA AUTORA DE LA TESIS

Estudio de la influencia de los puentes disulfuro extracelulares del receptor 5-HT_{2A} homodimérico en la farmacología antipsicótica

Dña. Marta Cimadevila Fondevila

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

En Santiago de Compostela, a x de diciembre de 2019

Fdo.

Marta Cimadevila Fondevila



AUTORIZACIÓN DOS DIRECTORES DE TESE

Estudio de la influencia de los puentes disulfuro extracelulares del receptor 5-HT_{2A} homodimérico en la farmacología antipsicótica

D. Jose Manuel Brea Floriani

Dna. María Isabel Loza García

INFORMAN:

Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por Dña. Marta Cimadevila Fondevila, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, a x de diciembre de 2019

Fdo.

Jose Manuel Brea Floriani

Fdo.

María Isabel Loza García



Para la realización de la presente tesis Doctoral se ha contado con la financiación otorgada por la Xunta de Galicia, el ministerio de Economía y Competitividad y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). La doctoranda ha sido beneficiada de una ayuda para la formación predoctoral: la ayuda de apoyo a la etapa predoctoral en las universidades del SUG, en los organismos públicos de investigación de Galicia y en otras entidades del Sistema gallego de I+D+i, cofinanciadas parcialmente por el programa operativo FSE Galicia 2014-2020, concedida por la Consellería de Cultura, Educación y Ordenación Universitaria.



ÍNDICE

Abreviaturas y siglas	17
Resumen/Abstract	29
Introducción	35
1 La esquizofrenia	37
1.1 Consideraciones generales	37
1.2 Etiopatogenia	38
1.3 Tratamiento con antipsicóticos	40
1.4 Dianas de los fármacos antipsicóticos	41
2 Receptores acoplados a proteínas G	44
2.1 Consideraciones generales	44
2.2 Modelos fenomenológicos de activación ligando-receptor: agonismo inverso y selectividad funcional	49
2.3 Condicionantes estructurales de la activación de los GPCRs	52
2.4 Dimerización de los GPCRs	57
3 Receptores serotoninérgicos: el receptor 5-HT _{2A}	62
3.1 Consideraciones generales	62
3.2 Distribución del receptor 5-HT _{2A}	63
3.3 Condicionantes estructurales de la activación del receptor 5-HT _{2A}	64
3.4 Señalización intracelular del receptor 5-HT _{2A}	69
3.5 Dimerización del receptor 5-HT _{2A}	73
Justificación	77
Antecedentes, hipótesis y objetivos	80
Materiales y métodos	87

1	Reactivos empleados en cultivo celular	89
1.1	Tampones y reactivos generales	89
1.2	Línea celular CHO-K1	89
1.3	Línea celular CHO-K1 5-HT _{2A}	89
1.4	Línea celular HEK293	89
1.5	Línea celular HEK293T/17	90
1.6	Línea celular Flp-In™ T-REx 293	90
1.7	Línea celular Flp-In™ T-REx™ 293-GPCR	90
2	Reactivos empleados en ensayos farmacológicos	90
3	Reactivos farmacológicos	91
4	Reactivos empleados en técnicas de biología molecular	92
1	Cultivo celular	93
1.1	Descongelación celular	93
1.2	Expansión celular	93
1.3	Criopreservación celular	93
1.4	Siembra celular en placas multipocillo	94
2	Generación de las construcciones plasmídicas del receptor 5-HT _{2A} humano y de los receptores mutados	94
2.1	Mutagénesis dirigida	94
2.2	Purificación del ADN plasmídico	96
2.3	Subclonaje a pcDNA5/FRT/TO	97
3	Generación de las líneas estables	99
4	Ensayos farmacológicos de unión de radioligandos en fracción de membrana	102
4.1	Preparación de homogeneizados de membrana	102
4.2	Ensayos de linealidad de proteína	103
4.3	Ensayos de saturación de radioligandos	103

4.4	Ensayos cinéticos: asociación y disociación	104
4.5	Ensayos de competición de radioligandos.....	105
5	Ensayos farmacológicos de unión de radioligandos en célula entera	105
5.1	Ensayos de linealidad de células	105
5.2	Ensayos de competición de radioligandos.....	106
6	Medida de acumulación de IPs intracelular.....	107
7	Medidas de movilización de calcio intracelular.....	108
8	Estudios de tráfico del receptor a la membrana celular	110
9	Análisis de la oligomerización del receptor 5-HT _{2A} por estudios de saturación de BRET.....	112
10	Análisis de la homodimerización del receptor 5-HT _{2A} por Western Blot.....	114
10.1	Preparación de la muestra.....	114
10.2	Western Blot.....	115
11	Análisis y procesamiento de datos	116
11.1	Ensayos de unión de ligandos.....	116
11.2	Ensayos funcionales	118
11.3	Ensayos de saturación de BRET.....	119
	Resultados	205
1	La pérdida de puentes disulfuro extracelulares condiciona la farmacología del receptor 5-HT _{2A} humano	123
1.1	El tratamiento con DTT 20 mM de células que expresan el receptor 5-HT _{2A} disminuyó la unión específica de [³ H]Ketanserina	123
1.2	El tratamiento con DTT 20 mM de células que expresan el receptor 5-HT _{2A} no modificó la cinética de unión de [³ H]Ketanserina	124

1.3	En presencia de DTT 20 mM la curva de competición de (±)DOI frente a [³ H]Ketanserina pasó a ser monofásica	125
1.4	El tratamiento con DTT 20 mM de células que expresan el receptor 5-HT _{2A} humano disminuyó la eficacia de los agonistas ...	129
1.4.1	El tratamiento del receptor 5-HT _{2A} con DTT 20 mM alteró la transducción de señales al valorar la acumulación de IPs.	129
1.4.2	Optimización de las medidas de movilización de calcio intracelular en células CHO-K1 5-HT _{2A}	132
1.4.3	El tratamiento del receptor 5-HT _{2A} con DTT 20 mM alteró la transducción de señales al valorar la movilización de calcio	137
2	La rotura del puente disulfuro extracelular C148 ^{3.25} -C227 ^{ECL-2} anula la farmacología del receptor 5-HT _{2A} humano	140
2.1	Se generó un nuevo modelo para el estudio de la influencia del puente disulfuro C148 ^{3.25} -C227 ^{ECL-2} en la farmacología del receptor 5-HT _{2A} humano.....	141
2.2	La ausencia del puente disulfuro C148 ^{3.25} -C227 ^{ECL-2} impidió la unión de [³ H]Ketanserina al receptor 5-HT _{2A} humano	143
2.3	La ausencia del puente disulfuro C148 ^{3.25} -C227 ^{ECL-2} impidió la unión de [³ H]LSD al receptor 5-HT _{2A} humano.....	147
2.4	La señalización mediada por el receptor 5-HT _{2A} se anula en ausencia del puente disulfuro C148 ^{3.25} -C227 ^{ECL-2}	154
3	La expresión del receptor 5-HT _{2A} en la membrana celular es dependiente del puente C148 ^{3.25} -C227 ^{ECL-2}	162
4	El puente disulfuro C148 ^{3.25} -C227 ^{ECL-2} no condiciona la naturaleza homodimérica del receptor 5-HT _{2A} humano	165
4.1	El receptor 5-HT _{2A} permaneció en forma oligomérica en ausencia del puente disulfuro conservado.....	165

4.2 La homodimerización del receptor 5-HT _{2A} resultó ser independiente de la formación de puentes disulfuro extracelulares...	167
Discusión	169
Conclusiones/conclusions	199
Referencias	205







ABREVIATURAS Y SIGLAS



(±)DOI	(±)2,5-Dimetoxi-4-iodoanfetamina
5-HT	5-hidroxitriptamina o serotonina
5-HT_{1A}	Receptor de serotonina 1A
5-HT_{1B}	Receptor de serotonina 1B
5-HT_{2A}	Receptor de serotonina 2A
5-HT_{2B}	Receptor de serotonina 2B
5-HT_{2C}	Receptor de serotonina 2C
5-HT₄	Receptor de serotonina 4
5-HT₇	Receptor de serotonina 7
A	Alanina
A₁	Receptor de adenosina 1
A_{2A}	Receptor de adenosina 2A
A₃	Receptor de adenosina 3
AA	Ácido araquidónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AT₂	Receptor de angiotensina 2
B2	Receptor de bradicinina 2
BI	Índice de balance, <i>balance index</i>
BiFC	Complementación bimolecular de fluorescencia, <i>bimolecular fluorescence complementation</i>

B_{\max}	Densidad máxima de sitios de unión
BRET	Transferencia de energía bioluminiscente, <i>bioluminescence resonance energy transfer</i>
BRET₅₀	Razón de emisiones YFP _C /RLuc _q *1000 a la que se obtiene el 50 % del BRET _{max}
BRET_{MAX}	Señal BRET máxima
BSA	Albúmina de suero bovino, <i>bovine serum albumin</i>
BT	Unión total, <i>Binding Total</i>
CB1	Receptor cannabinoide 1
CCR1	Receptor de citoquina 1
CCR2	Receptor de citoquinas 2
CCR5	Receptor de citoquinas 5
cr	Razón de emisión 530 nm/480 nm
CHO	Células de ovario de hámster chino, <i>Chinese hamster ovary cells</i>
cpm	Cuentas por minuto
CTC	Teoría del complejo ternario cúbico
C-term	Extremo carboxilo terminal
CXCR4	Receptor de citoquinas 4
D	Aspartato
D₁	Receptor de dopamina 1
D₂	Receptor de dopamina 2

D₃	Receptor de dopamina 3
Da	Dalton
DAG	Diacilglicerol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
E	Ácido glutámico
E	Eficacia del agonista
EC₅₀	Potencia del agonista
ECL	Bucle extracelular, <i>extracellular loop</i>
EEM	Error estándar de la media
E_{max}	Eficacia máxima del agonista
RE	Retículo endoplasmático
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares, <i>extracellular-signal-regulated kinase</i>
ETC	Teoría del estado ternario del receptor
eYFP	<i>Enhanced yellow fluorescent protein</i>
F	Fenilalanina
FBS	Suero bovino fetal, <i>fetal bovine serum</i>
FCS	Espectroscopía de correlación de fluorescencia, <i>fluorescence correlation spectroscopy</i>

FLIPR	Lector de placas de imagen fluorimétrica, <i>fluorimetric imaging plate reader</i>
FRAP	<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i>
FRET	Transmisión de energía resonante fluorescente, <i>fluorescence resonance energy transfer</i>
FSH	Receptor folículo estimulante
G	Glicina
g	Unidad relativa de medida de la aceleración igual a la aceleración de la gravedad
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GDP	Difosfato de guanosina
GLP-1	Receptor peptídico 1 tipo glucagón
Glu	Glutamato
GnRH	Receptor de gonadotropina
GPCR	Receptor acoplado a proteína G, <i>G-protein coupled receptor</i>
GRK	Quinasa de receptores acoplados a proteínas G, <i>G-Protein coupled receptor kinase</i>
GTP	Trifosfato de guanosina
H	Histidina
h	Horas
H₁	Receptor de histamina 1

H8	Hélice citosólica
HBSS	Solución salina tamponada de Hank, <i>Hank's balanced salt solution</i>
HEK293	Células embrionarias de riñón humano, <i>human embrionic kidney cells</i>
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HRP	Peroxidasa de rábano, <i>horseadish peroxidase</i>
I	Isoleucina
IC₅₀	Potencia del antagonista
ICL	Bucle intracelular, <i>intracellular loop</i>
IPs	Especies de inositol fosfato, <i>inositol phosphate species</i>
K_B	Constante de disociación en el equilibrio del complejo antagonista-receptor, potencia del antagonista
K_D	Constante de disociación en el equilibrio
K_i	Constante de afinidad
k_{obs}	Constante de asociación observada
k_{off}	Constante de disociación
k_{on}	Constante de asociación
KOR	Receptor kappa opioide
L	Leucina

LB	Medio de crecimiento bacteriano Luria Bertani
LSD	Dietilamida del ácido lisérgico, <i>lysergic acid diethylamide</i>
M	Masa molar
M₁	Receptor muscarínico 1
M₂	Receptor muscarínico 2
MAPK	Quinasas activadas por mitógeno, <i>mitogen-activated protein kinases</i>
mGlu2	Receptor metabotrópico de glutamato 2
mGlu4	Receptor de glutamato 4
mGlu5	Receptor metabotrópico de glutamato 5
min	Minutos
MOR	Receptores μ opioides
N	Asparagina
NA	Núcleo accumbens
NSB	Unión no específica, <i>Non-specific binding</i>
N-term	Extremo amino terminal
P	Prolina
PBS	Tampón fosfato salino, <i>phosphate buffer saline</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, <i>polimerase chain reaction</i>

PEI	Polietilenimina
PFA	Paraformaldehido
PFC	Corteza prefrontal, <i>Prefrontal cortex</i>
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa, <i>phosphoinositide 3-kinase</i>
PIP₂	Fosfatidilinositol bifosfato, <i>phosphatidilinositol biphosphate</i>
PKC	Protein quinasa C
pK_i	Logaritmo en base diez de la constante de inhibición
PLA	Ensayo de proximidad de ligación, <i>proximity ligation assay</i>
PLA₂	Fosfolipasa A ₂ , <i>phospholipase A₂</i>
PLC	Fosfolipasa C, <i>phospholipase C</i>
Receptor C148A	Receptor 5-HT _{2A} conteniendo la mutación C148A
Receptor C148A/C227A	Receptor 5-HT _{2A} conteniendo la mutación C148A/C227A
Receptor C227A	Receptor 5-HT _{2A} conteniendo la mutación C227A
Receptor WT	Receptor 5-HT _{2A} nativo
RFU	Unidades relativas de fluorescencia, <i>relative fluorescence units</i>
RIPA	Ensayo de radioinmunoprecipitación, <i>radioimmunoprecipitation assay</i>

RLuc	Luciferasa de <i>Renilla reniformis</i>
RLuc_q	Valores de emisión de RLuc crudos
S	Serina
s	Segundos
SB	Unión específica, <i>Specific Binding</i>
SDS	Dodecilsulfafo sódico, <i>sodium dodecyl sulphate</i>
SPA	<i>Scintillation proximity assay</i>
ST	Sin transfectar
T	Treonina
t_{1/2}	Tiempo de vida media
TBS-T	Tampón tris-salino suplementado con <i>Tween 20</i>
THC	Tetrahidrocannabinol
TM	Dominio transmembrana, <i>transmembrane domain</i>
TR	Proteína represora de tetraciclinas, <i>tetracycline repressor</i>
V	Valina
VTa	Área tegmental ventral, <i>ventral tegmental area</i>
W	Triptófano
Y	Tirosina

YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>
YFP_c	Valores de emisión de YFP corregidos
Y_{max}	Máxima asociación específica del radioligando
YSi	<i>Yttrium Silicate</i>
β₁	Receptor adrenérgico β tipo 1
β₂	Receptor adrenérgico β tipo 2







RESUMEN/ABSTRACT



RESUMEN

La esquizofrenia es una enfermedad mental crónica de etiopatogenia desconocida, con una prevalencia mundial del 1 %. Los fármacos antipsicóticos son fármacos poco eficaces y con múltiples efectos adversos, por lo que la búsqueda de alternativas que mejoren el pronóstico de estos pacientes resulta indispensable.

Todos los antipsicóticos tienen como diana receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), proteínas de membrana plasmática que resultan ser la diana de más del 30 % de fármacos disponibles en el mercado. En particular, para el efecto antipsicótico se ha descrito que el bloqueo de receptores de dopamina 2 es imprescindible, mientras que el bloqueo de otros GPCRs mejoraría su eficacia y/o disminuiría sus efectos adversos. Es el caso del antagonismo del receptor de serotonina 2A (5-HT_{2A}).

El receptor 5-HT_{2A} está ampliamente estudiado, pues se ha descrito que existe en forma homodimérica, que heterodimeriza con otros GPCRs implicados en esquizofrenia y que activa diferencialmente distintas vías de señalización. Sin embargo, las bases moleculares de su activación se desconocen, lo que dificulta el diseño de fármacos dirigidos a esta diana.

La reciente cristalización del receptor 5-HT_{2A} en presencia de los fármacos antipsicóticos risperidona y zotepina permitió determinar que existen dos regiones clave en su activación: el bolsillo de unión ortostérico y el bolsillo de unión extendido. Ambas regiones están conectadas por un puente disulfuro conservado en GPCRs, que ancla el dominio extracelular 2 al dominio transmembrana 3 a través de las cisteínas C227 y C148, respectivamente.

En la presente tesis doctoral se estudió el efecto de los puentes disulfuro extracelulares en la farmacología del receptor 5-HT_{2A} humano homodimérico, con dos aproximaciones: con un agente reductor inespecífico, ditiotreitól (DTT), y con la generación de tres mutantes incapaces de establecer el puente disulfuro

C148^{3.25}-C227^{ECL-2}. En base a esto, se demostró que (a) el tratamiento con DTT disminuyó la unión específica de [³H]Ketanserina al receptor 5-HT_{2A}; (b) la disminución en la unión se tradujo en una pérdida en la eficacia de agonistas, al medir la activación de PLC (c) la rotura específica del puente disulfuro C148^{3.25}-C227^{ECL-2} con técnicas de mutagénesis implicó la incapacidad de unir específicamente radioligandos por parte del receptor 5-HT_{2A}; (d) la incapacidad de unión de ligandos de los receptores mutados se tradujo en una activación mediada por PLC truncada; (e) la ausencia del puente disulfuro C148^{3.25}-C227^{ECL-2} comprometió la migración a la membrana celular del receptor mutado; (f) pero el receptor mutado mantuvo su naturaleza homodimérica.

ABSTRACT

Schizophrenia is a chronic mental disorder of unknown etiopathogenesis that affects 1 % of the population. Antipsychotic drugs are rather effective, and they have several side effects. Thus, the design of new drugs emerges as a necessity to improve the prognosis of these patients.

All antipsychotic drugs target G-protein coupled receptors (GPCRs), proteins located on the plasma membrane that are targeted by more than 30 % of the drugs available in the market. It has been described that blocking dopamine 2 receptors is mandatory for the antipsychotic effect, and the antagonism of other GPCRs, such as serotonin 2A (5-HT_{2A}), could be beneficial for the antipsychotic outcome.

5-HT_{2A} receptor has been widely studied: it exists as a homodimer and heterodimerizes with a lot of GPCRs involved in schizophrenia, it can differentially activate two signalling pathways. However, the molecular basis of its activation remains unknown, which hinders the design of new antipsychotic drugs.

The recent crystallization of 5-HT_{2A} receptor with the antipsychotic drugs risperidone and zotepine allowed the identification two key regions in its activation: the orthosteric binding site and the extended binding site. Both regions are connected by a disulphide bridge conserved among GPCRs, that anchors the extracellular loop 2 to transmembrane domain 3, by the cysteines C227 and C148, respectively.

In this PhD thesis, we studied the effect of the extracellular disulphide bridges in the homodimeric 5-HT_{2A} pharmacology, with two approaches: by using the unspecific reducing agent dithiothreitol (DTT) and by generating three mutated receptors incapable of maintaining the C148^{3.25}-C227^{ECL-2} disulphide bridge. Based on that, we proved that: **(a)** [³H]Ketanserin specific binding to 5-HT_{2A} receptor was decreased in the presence of DTT; **(b)** this decrease was translated into an agonist efficacy loss when measuring PLC activation; **(c)** the specific breakage of the C148^{3.25}-C227^{ECL-2} disulphide bridge by employing a mutagenesis approach, implied an incapability of binding ligands to 5-HT_{2A} receptor; **(d)** this incapability was translated into an impaired PLC activation; **(e)** the absence of the C148^{3.25}-C227^{ECL-2} disulphide bridge compromised 5-HT_{2A} receptor trafficking to the cell membrane; **(f)** but the mutated 5-HT_{2A} receptors remained in their homodimeric nature.





INTRODUCCIÓN



1 LA ESQUIZOFRENIA

1.1 Consideraciones generales

La esquizofrenia es un tipo de psicosis crónica con una prevalencia mundial del 1 % (1). En todos los pacientes psicóticos aparecen alucinaciones, delirios, lenguaje desorganizado y comportamiento agitado, que son los denominados “síntomas positivos”. Además, los pacientes con esquizofrenia sufren lo que se llaman “síntomas negativos”, que cursan con apatía, abulia, alogia, así como deterioro cognitivo (**figura 1**). La disfunción cognitiva es el mejor predictor del déficit funcional en los pacientes con esquizofrenia. Sin embargo, los síntomas negativos muestran una mejoría limitada con el tratamiento con antipsicóticos (2).

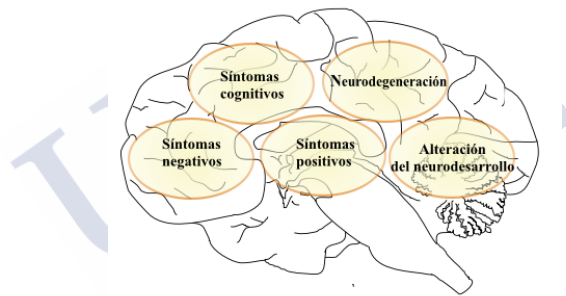


Figura 1. Síntomas asociados a esquizofrenia. Imagen realizada por la autora partir de Golam M Khandaker, 2015.

La enfermedad debuta con un brote psicótico, en la mayoría de los casos en la adolescencia, que se prolonga durante al menos 6 meses. La esperanza de vida de los pacientes diagnosticados con esquizofrenia es más corta que la de la población general, debido a la alta tasa de suicidio asociada a dicha enfermedad, así como al deterioro cognitivo derivado del tratamiento con antipsicóticos y al riesgo de desarrollar el denominado síndrome metabólico (4).

1.2 Etiopatogenia

La esquizofrenia se caracteriza por ser un trastorno del neurodesarrollo con genética compleja y fisiopatología todavía no del todo comprendidas. A pesar de que existen multitud de teorías acerca de la etiología de la enfermedad, parece que una sola no podría explicar por completo la sintomatología, sino que se tienen que dar una combinación de circunstancias para el desarrollo de la enfermedad.

Por una parte, varios estudios con gemelos demuestran que es una enfermedad heredable y, por lo tanto, ligada a la genética (5). Pero, lejos de ser el resultado de un defecto genético único, parece serlo de varias mutaciones o polimorfismos. Recientemente, Ripke y colaboradores publicaron un estudio de asociación del genoma completo, en el que identificaron 108 *loci* asociados a la esquizofrenia (6). Esta variabilidad genética es consistente con la heterogeneidad de la enfermedad clínica, y corrobora la necesidad de que sean varios los factores genéticos implicados en el desarrollo de la enfermedad.

Por otra parte, varios estudios demuestran que ciertas exposiciones ambientales confieren un mayor riesgo de padecer esquizofrenia, especialmente durante la fase del neurodesarrollo (7). Es por ello por lo que alteraciones fetales en el segundo cuatrimestre de embarazo cobran vital importancia en el potencial desarrollo de la enfermedad, como la exposición a nicotina durante el embarazo (8) o infecciones maternas por bacterias o virus como *Influenza* (9), sobre todo si cursan con inflamación (10). En menor medida, otros factores como infecciones en la infancia o el consumo de cannabis durante la adolescencia también pueden influir en la aparición de los síntomas psicóticos.

Fisiológicamente, se han propuesto alteraciones en varias regiones y conexiones en el cerebro como causa de la enfermedad (**figura 2**) (11,12). En particular, en la corteza prefrontal (PFC), implicada en funciones superiores del cerebro, se observa hipoactividad neuronal, mientras que en zonas subcorticales como el núcleo accumbens (NA), el ventral pallidum, la amígdala, el

hipocampo o el área tegmental ventral (VTA) aparece hiperactividad. Los neurotransmisores que participan en las conexiones de estas zonas cerebrales son la dopamina, el glutamato y el ácido gamma aminobutírico, a través de vías dopaminérgicas (mesolímbica y mesocortical), glutamatérgicas y gabaérgicas. Indirectamente, otros receptores como los serotoninérgicos 2A (5-HT_{2A}) presinápticos en neuronas dopaminérgicas, ampliamente distribuidos en PFC, actúan como inhibidores de la liberación de dopamina, jugando un papel importante en el desarrollo de la enfermedad (12).

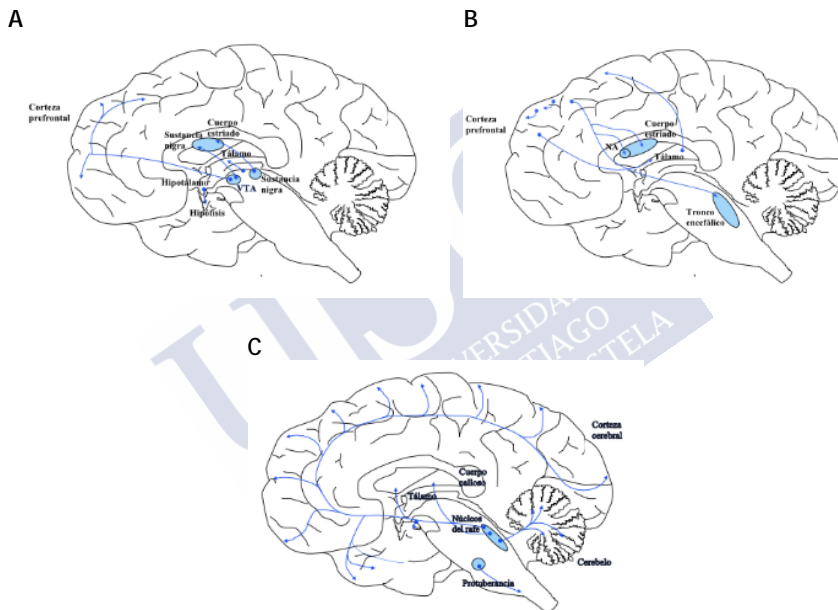


Figura 2. Representación de las vías dopaminérgicas (A), glutamatérgicas (B) y serotoninérgicas (C). Imagen realizada por la autora a partir de Stahl, 2008.

La descripción de estas alteraciones comenzó con la comprensión de la neurobiología y farmacoterapia de la esquizofrenia, basándose en la propuesta hipótesis dopaminérgica. Esta defiende que dicha enfermedad se debe a una hiperfunción dopaminérgica en zonas mesolímbicas, como consecuencia de una hiperactividad glutamatérgica en la PFC. Por ello, los primeros neurolépticos o antipsicóticos estaban destinados a bloquear receptores de dopamina.

Con la introducción de nuevos antipsicóticos se ha visto que un bloqueo serotoninérgico podría ser crucial para la actividad antipsicótica (14). Más recientemente se ha descrito un componente neuro inflamatorio en este trastorno, relacionado con niveles elevados de interleuquina 6 (15), lo que ha llevado al estudio de antiinflamatorios no esteroideos como el celecoxib como terapia coadyuvante en la enfermedad (3,16).

1.3 Tratamiento con antipsicóticos

Los fármacos antipsicóticos se dividen tradicionalmente en dos grupos según su mecanismo de acción: antipsicóticos típicos y atípicos.

Los antipsicóticos típicos o de primera generación son antagonistas de receptores de dopamina tipo 2 (D_2), como el haloperidol o la clorpromazina, y palían los síntomas positivos, pero son poco eficaces frente a síntomas negativos (17). Además, producen efectos adversos no deseados de tipo extrapiramidal, como parkinsonismo, y de tipo endocrino, como un aumento en la secreción de prolactina.

Los antipsicóticos atípicos o de segunda generación bloquean además de los receptores D_2 , los receptores $5-HT_{2A}$. Ejemplos de fármacos de este tipo son la clozapina, la risperidona o la quetiapina. Son efectivos con síntomas positivos, pero no tanto como los típicos, pues aumentan la liberación de dopamina a nivel de la PFC sin aumentar la del NA. Su principal ventaja es que son eficaces en la reducción de síntomas de tipo negativo, además de que no inducen efectos extrapiramidales. En particular, la clozapina se considera el *gold standard* en el tratamiento de la esquizofrenia, si bien la agranulocitosis que desencadena en hasta el 10 % de los pacientes la coloca en segundo plano en la línea de tratamiento (18).

A pesar de que el arsenal terapéutico es amplio, en muchos casos es poco efectivo, debido a la complejidad inherente a la enfermedad. El tratamiento empírico de una esquizofrenia comienza con un antipsicótico de segunda generación, al que se le pueden sumar otros

antipsicóticos. Además, como coadyuvantes en el tratamiento, se suelen pautar benzodiacepinas en caso de ansiedad que no cede con los antipsicóticos, e incluso antidepresivos para paliar síntomas negativos (19). La completa comprensión de los mecanismos implicados en tan compleja enfermedad permitirá el desarrollo de medicamentos más efectivos y seguros.

1.4 Dianas de los fármacos antipsicóticos

Una característica compartida a todos los antipsicóticos presentes en la actualidad en el mercado es que son fármacos “sucios” que ejercen su efecto a través de numerosas dianas: receptores dopaminérgicos, serotoninérgicos, adrenérgicos y muscarínicos, entre otros (**figura 3**) (20,21). Esto conduce a que durante los últimos años se hayan destinado numerosas investigaciones a dilucidar cuáles son los condicionantes que llevan a que un fármaco se comporte de como antipsicótico típico o atípico.

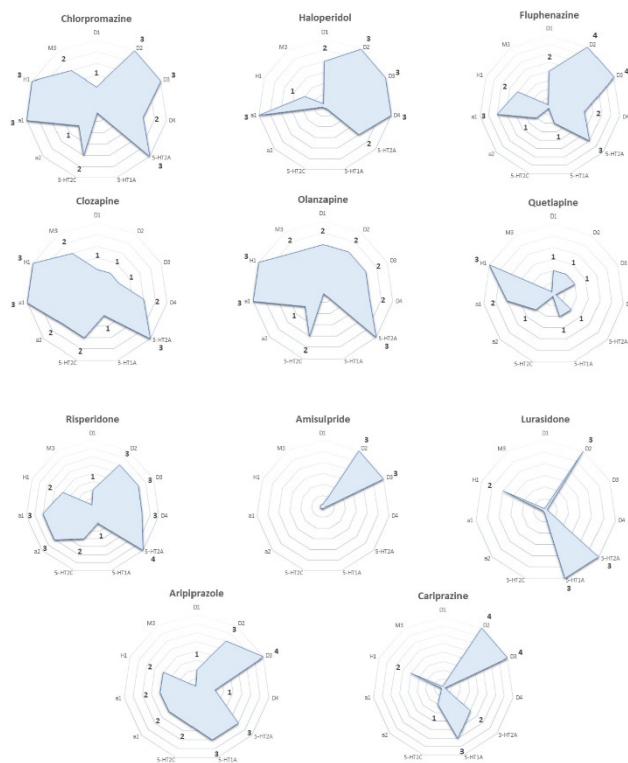


Figura 3. Representación de la afinidad por múltiples receptores de los principales antipsicóticos disponibles en el mercado. Con permiso de Elsevier (20).

La hipótesis planteada por Meltzer y colaboradores ha sido de mucha utilidad para el descubrimiento de fármacos como la risperidona o la quetiapina (Meltzer, Matsubara, y Lee, 1989). Estos autores propusieron que para clasificar a un antipsicótico dentro de los de segunda generación (antipsicóticos atípicos) debía tener una relación pK_i 5-HT_{2A}/ pK_i D₂ > 1,12 y para ser típico, < 1,09, siendo la pK_i el logaritmo en base diez de la constante de inhibición del fármaco sobre los receptores 5-HT_{2A} y D₂. Esta teoría revolucionaria en su momento suponía que no sólo la inhibición dopaminérgica era necesaria para tener efectos antipsicóticos, sino que para ser eficaz frente a síntomas negativos y evitar efectos extrapiramidales, también

era necesario un bloqueo de los receptores 5-HT_{2A} mayor que el ejercido sobre los receptores D₂.

Esta hipótesis fue posteriormente cuestionada y reevaluada. Kapur y Remington sugirieron que lo que distinguía los fármacos atípicos de los típicos era la rapidez de disociación del fármaco del receptor D₂ (23), y Westerink defendió que el efecto antipsicótico atípico se debía a una moderada ocupación de receptores D₂ (24). Sykes y colaboradores estudiaron, posteriormente, las cinéticas de asociación/disociación de los antipsicóticos a receptores dopaminérgicos y serotoninérgicos y concluyeron que todos los antipsicóticos se disocian rápidamente, pero la diferencia entre típicos y atípicos es que estos últimos presentan constantes de disociación más elevadas; esto es, se disocian más lentamente y, por lo tanto, permanecen más tiempo bloqueando receptores dopaminérgicos y serotoninérgicos (25).

Otra hipótesis es la compartimentación del efecto de los antipsicóticos. La cuantificación de la cantidad de antipsicóticos en distintas áreas cerebrales en ratas permitió la diferenciación en la distribución de fármacos típicos y atípicos, pudiéndose determinar que el haloperidol poseía un perfil de distribución cerebral distinto que clozapina o risperidona (26). Este efecto diferenciador podría reflejarse incluso en las vías de señalización de los receptores. Pereira y colaboradores describieron diferencias temporales en la fosforilación de quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) en la PFC y el estriado: la clozapina reduce la fosforilación de ERK en tratamientos agudos, pero la aumenta en tratamientos crónicos, en ambas regiones cerebrales, mientras que el haloperidol reduce la fosforilación ERK en la PFC y la aumenta en el estriado (27).

Con el progresivo estudio del comportamiento de GPCRs en forma dimérica, surgieron varias hipótesis en las que la formación de homodímeros, heterodímeros y oligómeros de receptores podría contribuir tanto en el desarrollo de la enfermedad como en la terapia antipsicótica. Fribourg y colaboradores proponen el índice de balance (BI) como predictor de moléculas anti o pro-psicosis: la tendencia del

heterodímero formado entre el receptor de glutamato (Glu) y el receptor 5-HT_{2A} (Glu-5-HT_{2A}) a activar distintas proteínas G efectoras, condicionará la actividad antipsicótica y el efecto psicodélico de moléculas como la dietilamida del ácido lisérgico (LSD) (28).

En definitiva, a pesar de que son múltiples las hipótesis que tratan de explicar la diferencia entre antipsicóticos típicos o atípicos, hoy día la razón última de su distinción en comportamiento continúa sin conocerse, pero todas ellas apuntan a su interacción con GPCRs.

2 RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G

2.1 Consideraciones generales

Los GPCRs representan la más amplia familia de receptores de membrana incluidos dentro del genoma humano, aproximadamente un 80 %, de los que un 50 % se considera como potenciales dianas farmacológicas (29). En la actualidad, se estima que aproximadamente 30 % de los fármacos comercializados tiene como diana a estas proteínas (30).

Para su identificación, se clasifican en función de la homología existente entre ellos: la clase A o familia de la rodopsina; clase B o familia de la secretina; clase C o familia del glutamato; clase D o receptores de feromonas, clase E o receptores de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y clase F o receptores *frizzled/smoothened* (31) (**figura 4**).

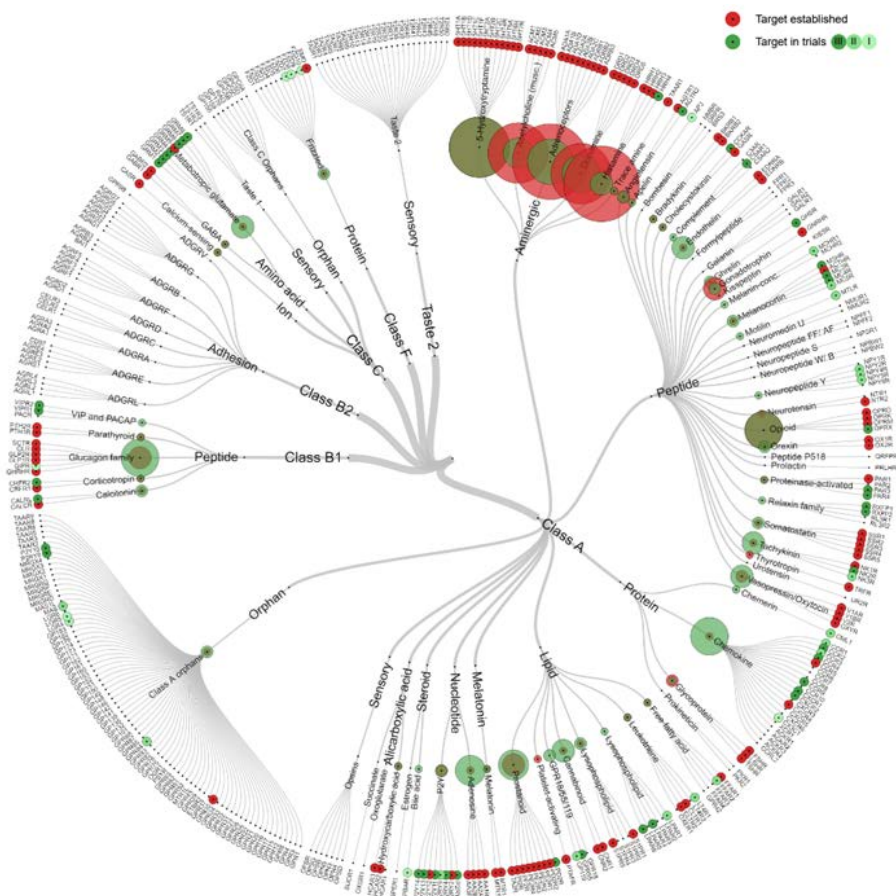


Figura 4. Clasificación de los GPCRs y su participación como dianas de fármacos en el mercado (coloración roja) o en ensayos clínicos (coloración verde). Imagen obtenida de Pándy-Szekeres *et al.*, 2018.

Estructuralmente, son proteínas de membrana formadas por un extremo amino terminal (N-term), siete hélices transmembrana (TM-1 a TM-7), tres bucles intracelulares (ICL-1 a ICL-3) y tres bucles extracelulares (ECL-1 a ECL-3), una hélice citosólica (H8) y el extremo carboxilo terminal intracelular (C-term). Los siete dominios transmembrana están implicados en transmitir los estímulos extracelulares al citoplasma. Entre dichas hélices existe un bolsillo de unión al que se une el ligando para desencadenar la respuesta

intracelular, que se denomina sitio de unión ortostérico. Además, en la parte extracelular existen distintos puntos de unión de ligandos, menos conservados, que modulan la respuesta del ligando ortostérico; denominados sitios de unión alostéricos (**figura 5**).

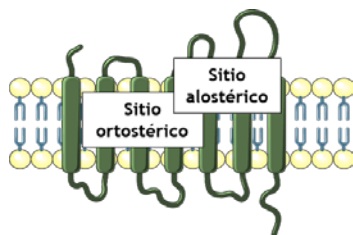


Figura 5. Esquema de un GPCR de clase A con su sitio de unión ortostérico y sitio de unión alostérico. Imagen realizada por la autora.

Se entiende por interacción alostérica al mecanismo molecular por el cual un ligando interacciona con un receptor para modificar la afinidad y/o la funcionalidad del ligando ortostérico por su lugar de unión: si favorecen la unión de un ligando ortostérico se denomina modulador alostérico positivo y, si la disminuye, se denomina modulador alostérico negativo. De esta forma, el ligando alostérico y el ligando ortostérico no interaccionan entre ellos, sino que la unión de un ligando alostérico implica una serie de cambios conformacionales que afectarán al efecto del ligando ortostérico (33). Para favorecer esta interacción se han desarrollado los llamados ligandos bitópicos, aquellos que unen un ligando ortostérico con un ligando alostérico, separados por un espaciador (34).

Los ligandos alostéricos se presentan como una potencial herramienta farmacológica. Es el caso del modulador alostérico negativo OptoGluNAM4.1, del receptor metabotrópico de glutamato 4, mGlu4. Es un ligando fotoisomerizable que, en presencia de luz se activa y modula la unión de ligandos ortostéricos, y que por ello se utiliza como herramienta para estudios *in vitro* e *in vivo* del receptor (35).

Además, los moduladores alostéricos surgen como una nueva aproximación terapéutica al permitir la modulación del efecto

ortostérico. Los agonistas del receptor serotoninérgico 2C, 5-HT_{2C}, surgen como una diana para el tratamiento de la obesidad. La modulación alostérica positiva de este efecto ha demostrado disminuir la ingesta de comida en ratas, con lo que este mecanismo podría surgir como un nuevo tratamiento esta enfermedad (36).

Todos los GPCRs comparten una vía canónica de activación, que comienza con unión del ligando al bolsillo de unión ortostérico, tras lo que se desencadena un cambio conformacional que se propaga por toda la proteína. La consecuencia última de la unión es la alteración de los bucles intracelulares, de forma que a ellos se les pueda unir una molécula transductora, una proteína G heterotrimérica formada por tres subunidades: α , β y γ , unidas a difosfato de guanosina (GDP). Cuando el receptor se activa, la subunidad α se desliga del conjunto $\beta\gamma$, y cada subconjunto activa distintas cascadas de señalización al intercambiarse el GDP por trifosfato de guanosina (GTP).

Existen cuatro tipos de proteínas G_α en función de la proteína amplificadora a la que se asocien: $G_{i/o}$ y G_s , ligadas a adenilato ciclasa; G_q , ligada a la fosfolipasa C; y $G_{12/13}$, ligada a Rho GTPasa (37). La mayoría de los GPCRs son promiscuos, con lo que la activación de un GPCR resulta en la activación de varias cascadas dependientes de distintas subunidades G_α (**figura 6**).

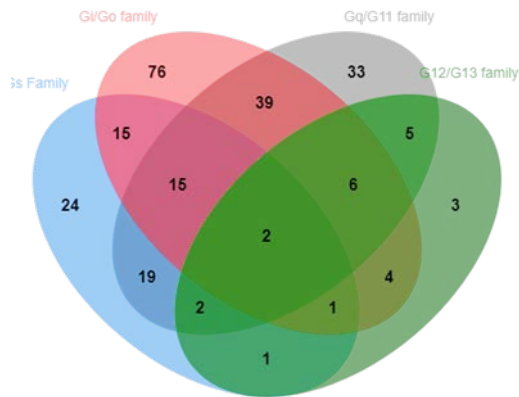


Figura 6. Número de receptores acoplados a las distintas proteínas G en todas las familias de GPCR. Gráfica tomada de Pándy-Szekeres *et al.*, 2018.

Además de la activación canónica, existe la activación de GPCRs independiente de proteína G, mediada por quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) y por las β -arrestinas, dando lugar a la desensibilización e internalización del receptor.

Las GRKs constituyen una familia de proteínas compuesta por 7 isoformas, que fosforilan residuos serina/treonina en los bucles intracelulares y extremo carboxilo-terminal de GPCRs. Su función es la regulación de GPCRs, al activar la vía de las arrestinas. En particular, se ha descrito que la GRK2/3 regula la micro difusión inducida por un péptido opioide sintético, DAMGO, agonista del receptor μ -opioide (MOR) en la membrana plasmática, así como su reorganización en cúmulos para posterior internalización (38).

La familia de las arrestinas se compone de cuatro miembros, pero son la β -arrestina 1 y la β -arrestina 2 las responsables de la desensibilización de GPCRs vía endocitosis clatrina-dependiente. La fosforilación de GPCRs inducida por GRKs promueve la traslocación de arrestinas, que se unen a la región intracelular del receptor en estado activo, interrumpiendo la señalización a través de la proteína G y favoreciendo la señalización vía cascada de las quinasas activadas por mitógeno (MAPK), ERK y Src (39).

A pesar de que las vías de señalización dependiente e independiente de proteína G se tienden a estudiar por separado, estas no están compartimentadas a nivel intracelular, sino que están interconectadas.

Por ejemplo, la activación de la PLC se asocia a activación de proteínas G, en particular de G_q . En el receptor adrenérgico beta 2 (β_2), se ha demostrado que la PLC se puede activar de manera independiente a la proteína G, produciendo una movilización de calcio (40).

Por otro lado, la señalización de GPCRs a través de ERK se asocia tradicionalmente a β -arrestinas. Sin embargo, la construcción de dos sistemas, uno incapaz de señalizar vía proteína G y otro incapaz de señalizar vía β -arrestinas evidenció el papel de la proteína G en la señalización de ERK para tres receptores de clase A: el receptor D prostanoide, el receptor huérfano GPR17 y receptor de ácidos grasos 2 (41).

De esta forma, la activación o inactivación de un GPCR es un proceso complejo, que puede resultar en la activación de numerosas y relacionadas vías de señalización.

2.2 Modelos fenomenológicos de activación ligando-receptor: agonismo inverso y selectividad funcional

La idea clásica de que un agonista es un ligando que se une al bolsillo de unión ortostérico de un receptor en estado inactivo y lo transforma a activo ha evolucionado, a lo largo de varias teorías que tratan de explicar los modelos fenomenológicos de activación de GPCRs.

La primera consideración a tener en cuenta es que al complejo ligando-receptor hay que sumarle una proteína G heterotrimérica. Esta teoría, llamada teoría del estado ternario del receptor (ETC) tiene en cuenta que la activación de un GPCR incluye una proteína G. Así, un antagonista no es simplemente un bloqueante estérico del receptor, sino que es un ligando que estabiliza una conformación del receptor

en la cual este no es capaz de interaccionar con proteínas que median la señalización intracelular.

Como resultado, se admite que los GPCRs coexisten en al menos tres conformaciones: una inactiva, otra activa y otra activa ligada a proteína G. Pero hay evidencias de que existen múltiples conformaciones en ausencia de ligandos. Entre ellas, algunas son capaces de producir un efecto farmacológico en ausencia de estímulo. Esto se denomina actividad constitutiva del receptor. Un ligando capaz de unirse a esta conformación auto activa del receptor, impidiendo la generación de efecto farmacológico en ausencia de estímulo se llama agonista inverso, y su descripción hizo evolucionar la teoría ETC al modelo ternario extendido (42).

El ETC extendido fue el primer modelo de GPCRs que incorporó explícitamente transiciones alostéricas entre estados del receptor e interacciones entre múltiples lugares de unión. Con el tiempo, fue extendido al complejo ternario cúbico (CTC), mucho más exacto que el ETC, pero menos funcional en la práctica.

Una aplicación del CTC es la reciprocidad de interacción entre lugares de unión alostéricos y ortostéricos. Si se considera que además de una proteína G y un ligando, al GPCR se le puede unir un modulador alostérico, esta última molécula podría ser la responsable del desplazamiento de los equilibrios, tanto hacia el estado activo como hacia el estado inactivo; es el modelo alostérico de los dos estados, que demuestra que un modulador alostérico tiene las propiedades de modificar potencialmente el lugar ortostérico de unión del agonista sin tener eficacia (33) .

Actualmente se sabe que un agonista puede estabilizar múltiples estados activos del receptor, para estimular selectivamente distintas cascadas de señalización. Esto es lo que se conoce como tráfico de estímulo (43).

Asumiendo que un receptor puede adoptar múltiples conformaciones activas e inactivas, un ligando podrá estabilizar de

forma diferencial unas u otras. Esto es lo que se denomina agonismo sesgado o selectividad funcional (**figura 7**).

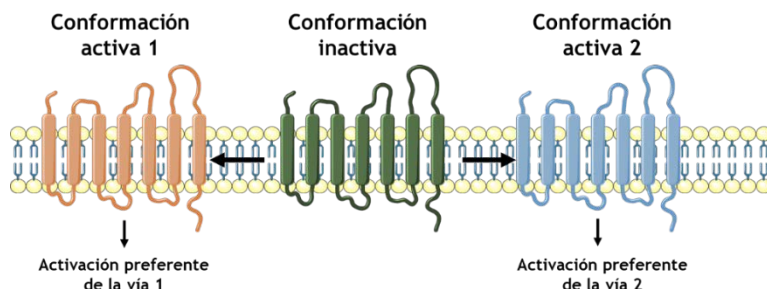


Figura 7. Representación de la estabilización diferencial de dos conformaciones activas de un GPCR. Imagen realizada por la autora.

Para explicar la selectividad funcional se han desarrollado modelos múltiples del estado del receptor, como el modelo de tres estados propuesto por Leff (44). Propone que los múltiples estados conformacionales del receptor coexisten en el equilibrio, de forma que cada ligando tendrá más afinidad por cada uno de ellos. Y de esto se deriva su agonismo sesgado.

El fenómeno de selectividad funcional, que incrementa la complejidad de los modelos fenomenológicos de interacción ligando-receptor, se ha descrito en las principales clases de GPCRs. Uno de los primeros receptores en los que se describió el fenómeno de selectividad funcional fue el receptor 5-HT_{2A} (45). Posteriormente, en esta subclase de receptores se ha demostrado la estabilización de distintas conformaciones del receptor para el receptor de serotonina 1B, 5-HT_{1B} (46) o el receptor de serotonina 2B, 5-HT_{2B} (47), entre otros.

A los receptores serotoninérgicos se le han sumado otros receptores de la clase A pero de diversos tipos, como el receptor D₂ (48), para el que la cinética de disociación parece el principal determinante en el sesgo funcional, o el de adenosina 3 (A₃) (49), que cuenta con un modelo estructura-actividad de los factores determinantes en su agonismo sesgado. Incluso se ha demostrado *in*

vivo el agonismo sesgado de diversos agonistas sobre el receptor kappa opioide (KOR), mediante técnicas de fosfoproteómica: el perfil de fosforilación proteico depende del agonista empleado y de la región cerebral estudiada (50).

Pero no solo en la clase A se ha descrito este fenómeno. Diversos estudios en el receptor peptídico 1 tipo glucagón (GLP-1), un GPCR de clase B, han demostrado que el dominio N-term extendido que poseen les permite establecer numerosos contactos de unión con ligandos, de forma que puedan diferenciar entre la activación dependiente de proteína G y la independiente de proteína G (51). Para el receptor metabotrópico de glutamato 5 (mGlu5) de clase C, Sengmany y colaboradores probaron que se puede modular alostéricamente la vía de señalización de dicho receptor (52).

2.3 Condicionantes estructurales de la activación de los GPCRs

Los modelos fenomenológicos de activación de GPCRs permiten la definición teórica de los múltiples estados conformacionales de GPCRs. Pero es la caracterización de los residuos implicados en la interacción del ligando con el receptor lo que permite conocer a la perfección la base molecular de la activación de GPCRs y, por tanto, desarrollar fármacos más eficaces y selectivos.

La herramienta más empleada para la determinación de las regiones implicadas en la unión de ligandos, y posterior activación de receptores, es la cristalización de GPCRs junto con ligandos o proteínas G. El primer receptor en cristalizarse fue el receptor de rodopsina en el año 2000, un receptor de clase A atípico que posee su ligando unido con enlaces covalentes y se activa en presencia de un estímulo (53). Debido a la complejidad inherente a la cristalización de proteínas y a la inestabilidad de los múltiples estados conformacionales de los GPCRs, la primera vez que se cristalizó un GPCR unido a un ligando que establece enlaces no covalentes con su receptor fue el receptor β_2 en 2007. En los últimos 12 años, el número de receptores cristalizados aumentó progresivamente (**figura 8**).

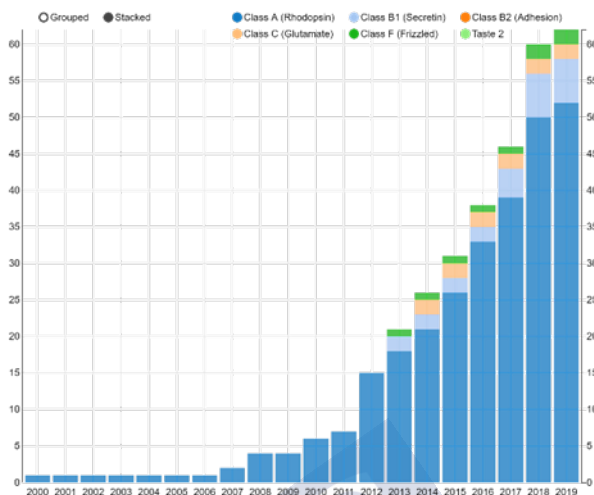


Figura 8. Relación del número de GPCRs cristalizados por año. Gráfica tomada de Pándy-Szekeres *et al.*, 2018.

En la actualidad, se conoce la estructura cristalina de más de 60 GPCRs (la clase más cristalizada es la clase A), pero la mayoría se han cristalizado en presencia de un ligando antagonista: las cinéticas de disociación de ligandos antagonistas tienden a ser más elevadas, existiendo incluso ligandos pseudoirreversibles (54), que se unen durante largos periodos de tiempo al receptor. Ello permite la estabilización de una conformación, y su posterior cristalización. Sin embargo, pocos son los ejemplos de GPCRs cristalizados en su conformación activa, por lo que los mecanismos moleculares de activación de GPCRs por agonistas totales, agonistas parciales y agonistas sesgados, continúa siendo una tarea por resolver.

En un sentido amplio, la región extracelular modula el acceso de ligandos al bolsillo de unión ortostérico y, por ello, está menos conservada que el extremo intracelular, ya que el extremo intracelular interacciona con proteínas citosólicas para activar cascadas conservadas de señalización intracelular. La presencia de residuos conservados entre GPCRs permitió que Ballesteros-Weinstein propusiesen una nomenclatura de aminoácidos de GPCRs, en la que al residuo más conservado en cada dominio transmembrana se le asigna

la posición 50, y el resto de residuos en ese dominio se nombran en función a él (55). Esto permite la fácil comparación de residuos entre GPCRs.

La primera característica que comparten todos los GPCRs de clase A es un bolsillo de unión ortostérico localizado entre todos los dominios transmembrana, una hendidura que acomoda ligandos muy profundamente (56). Se ha descrito que TM-3 es el dominio transmembrana con mayor representación en el enlace a ligandos entre la clase A de GPCRs (57), así como es el responsable de mantener la conformación del receptor, al compartir interfaz con otros dominios transmembrana (**figura 9**).

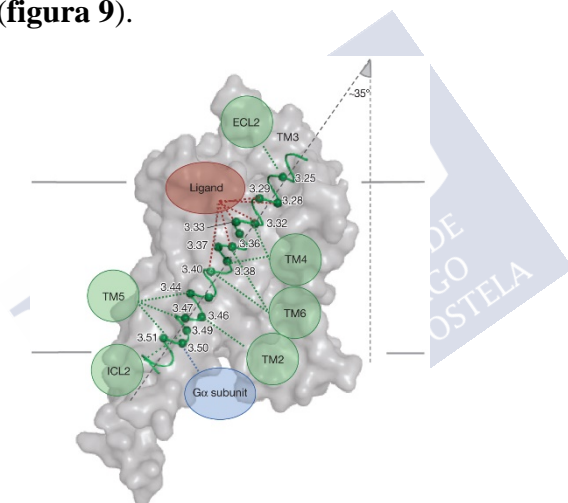


Figura 9. Papel del TM-3 en la estructura, unión de ligandos y función de GPCRs de clase A. El esqueleto de TM-3 se muestra en gris, y los residuos que enlazan con otros dominios del receptor se representan de color verde. Imagen reproducida de A J. Venkatakrishnan *et al.*, 2013, con permiso de Springer Nature.

En el extremo extracelular, los tres bucles que conectan los dominios transmembrana participan en la unión a ligandos. En tanto que el ECL-1 participa en mantener la estructura del bolsillo de unión ortostérico, el ECL-2 influye en la unión de ligandos y el ECL-3 está relacionado con la activación de distintas cascadas de señalización (58). Se considera que estos tres bucles extracelulares, junto con el

extremo N-term del receptor, participan en la formación del bolsillo de unión extendido de GPCRs en receptores como los dopaminérgicos (59), en el receptor 5-HT_{1B} (60), o en el receptor 5-HT_{2C} (61). Las alteraciones en esta región implican cambios drásticos en la unión de ligandos en algunos GPCRs. Por ejemplo, para el receptor 5-HT_{2B}, la alteración del bolsillo de unión extendido implica la pérdida del agonismo sesgado de lisurida y LSD (47).

Además, se ha descrito que varios residuos del ECL-2 de receptores como el de rodopsina, adenosina o citoquinas, interactúan directamente con ligandos (**tabla 1**). Para el receptor β_2 , la transición entre la conformación inactiva-activa pasa por la interacción del ligando con los residuos histidina H178^{ECL-2} y fenilalanina F194^{ECL-2} de este bucle extracelular (62).

Tabla 1. Residuos del ECL-2 relacionados con la interacción con ligandos. C0 representa la cisteína conservada de ECL-2. Adaptado con permiso de Springer Nature (63).

Residuos del ECL-2 que interactúan con el ligando									
Receptor	Ligando	C-3	C-2	C-1	C0	C+1	C+2	C+3	C+4
Rodopsina	11- <i>cis</i> -retinal			S186		G188	I189		W191
β_1 AR	cianopindolol						F201		T203
β_2 AR	carazolol						F193		
A _{2A} R	ZM241385						F168	E169	
D3R	eticloprida						I183		
CXCR4	IT1t	D183		I185	C186	D187			
CXCR4	CVX15					D187	D188		Y190

Otra característica del ECL-2 es que se comporta como una tapa sobre el bolsillo de unión ortostérico en ciertos GPCRs y que, por lo tanto, participa en su cinética de unión a GPCRs. Es el caso del receptor 5-HT_{2B} (64) o el receptor de rodopsina (53). Además, se ha

determinado su papel en alosterismo. Para el receptor muscarínico 2 (M₂) la mutación de los residuos valina V171^{ECL-2} y asparagina N419^{ECL-2} conduce a la alteración de la unión de moduladores alostéricos (65).

Una característica común a más del 90 % de los GPCRs es el anclaje de ECL-2 y TM-3 mediante dos cisteínas que forman un puente disulfuro, confiriendo estabilidad al bolsillo de unión ortostérico (57,63). Además, existe un número variable de cisteínas extracelulares que pueden participar en la formación de puentes disulfuro adicionales: intra-hélices (ECL-2 y ECL-3), inter-hélices y con el extremo N-term (66).

Con respecto al extremo intracelular, se han podido definir unos dominios conservados en GPCRs denominados “motivos”, que participan en la activación de todos ellos. Cerca del extremo citoplasmático del TM-3 está el motivo aspartato-(ácido glutámico)-tirosina D(E)^{3.49}-R^{3.50}-Y^{3.51}, relacionado con la actividad basal y el estado inactivo de GPCRs, pues mantiene el cierre iónico entre D-R, característico del estado inactivo de GPCRS; el motivo prolina-isoleucina-fenilalanina P^{5.50}-I^{3.40}-F^{6.44}, relacionado con un estado intermedio entre conformación inactiva-activa (67); y el motivo asparagina-prolina-tirosina N-P^{7.50}-xx-Y, en el extremo citoplasmático de TM-7, relacionado con la estabilización de la conformación activa del receptor.

Como consecuencia del agonismo sesgado, un ligando puede promover la activación de una u otra vía de señalización diferencialmente, por lo que los residuos implicados en la activación serán distintos. En el caso de los receptores de angiotensina, se ha demostrado que el sesgo hacia la activación de las β -arrestinas o las proteína G radica en la distinta colocación de los dominios transmembrana (68). Para el receptor 5-HT_{2C}, los residuos triptófano W358^{6.48} y fenilalanina F354^{6.44} están ligados a activación de proteínas G, pero no a las β -arrestinas (61).

La activación de GPCRs implica a los dominios TM-6 y TM-3, principalmente (**figura 10**). Cuando un ligando se une a un GPCR, el

extremo extracelular de TM-6 se mueve hacia el extremo extracelular de TM-3. Esta posición facilita la interacción con proteínas G citosólicas (69), específicamente con residuos de TM-3, TM-5 y TM-6, junto con ICL-2 e ICL-3 (70). Para la clase A de GPCRs, se ha descrito que los residuos 3.46, 6.37 y 7.53 están directamente implicados en la unión de la proteína G (71).

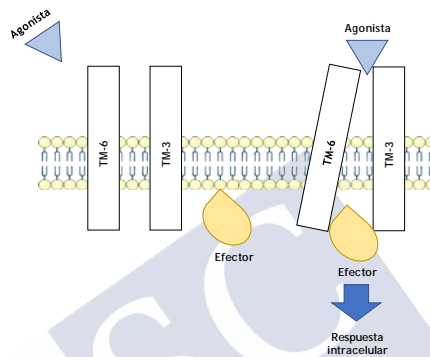


Figura 10. Esquema de la implicación de los dominios TM-3 y TM-6 en la activación de GPCRs. Cuando un agonista interacciona con el extremo extracelular del receptor, TM-6 rota para acomodarse al efector en el extremo intracelular. Imagen realizada por la autora.

2.4 Dimerización de los GPCRs

Durante muchos años se consideró únicamente la existencia de GPCRs en forma monomérica. Sin embargo, en las últimas décadas, numerosos estudios indican que los GPCRs interaccionan entre ellos, formando homodímeros (dos subunidades iguales), heterodímeros (dos subunidades distintas) u oligómeros (más de dos subunidades). Cada una de las subunidades que conforman un oligómero se llama protómero.

Los dominios implicados en esta interacción se desconocen, si bien se pueden definir dos grandes subgrupos para la definición de la interfaz dimérica:

- Aquellos receptores en los que TM-1, TM-2 y H8 son los principales dominios implicados en la dimerización, como es el caso del receptor KOR (72) o el β_2 (73).
- Aquellos receptores en los que TM-4 y TM-5 son los dominios predominantes, como el receptor de serotonina 1A, 5-HT_{1A} (74) o el receptor D₂ (75). En algunos casos, TM-1 juega un papel en la interfaz dimérica también, como es el caso del receptor 5-HT_{2C} (76).

Ambos subgrupos confluyen en el receptor de rodopsina, donde se ha propuesto el intercambio entre interfaces en función del estado conformacional del receptor (77), o en el caso de oligómeros formados por dos homodímeros, como es el caso del oligómero del receptor de adenosina 2A (A_{2A}) y D₂ (78).

Otro debate que incumbe la dimerización de GPCRs implica la estequiometría oligómero-proteína G, pues caben dos posibilidades: que cada protómero mantenga su capacidad de unión a su proteína G, o que el oligómero se una a una única proteína G.

En el heterodímero de receptores de adenosina 1 (A₁) y A_{2A}, cada uno de los protómeros mantiene su proteína G, apareciendo incluso entre ellas una comunicación cruzada que modula su funcionalidad (79), al igual que en el heterodímero A_{2A}-D₂ (78). Sin embargo, en el homodímero de receptores de dopamina D₂-D₂, solo hay presente una proteína G, pues el homodímero se comporta como una unidad (80), al igual que en el homodímero 5-HT_{2C}-5-HT_{2C}, dado que la mutación del residuo serina S^{3.36} en uno de los dos protómeros del dímero impide la señalización intracelular al medir acumulación de especies de inositol fosfato, IPs (81).

Así, con la descripción de la dimerización de GPCRs se plantearon los dímeros como una nueva diana farmacológica. Alteraciones en su formación o función están implicadas en enfermedades como la esquizofrenia (11). Esto es debido a que las propiedades de los receptores en forma monomérica no siempre coinciden con las

propiedades del receptor en forma dimérica, y por ello requieren de estudios específicos.

Por una parte, existen dímeros obligados, como es el caso del receptor mGlu5 (82) y del receptor D₂ (80), para los que la mínima unidad funcional es el homodímero. En general, la formación de dímeros es esencial para la funcionalidad de receptores de clase C, mientras que los receptores de clase A y B pueden estabilizar conformaciones activas como monómeros o en forma dimérica (83).

Por otra parte, otros GPCRs coexisten en forma monomérica y heterodimérica. Se ha descrito que el receptor muscarínico 1 (M₁) coexiste en ambas formas, y que el balance en la formación de dímeros puede modularse en presencia de ligandos (84).

Otra consecuencia que surge de la formación de dímeros es la cooperatividad entre protómeros. La cooperatividad deriva de la capacidad que tiene cada uno de los protómeros para modular las capacidades de unión y función de los otros protómeros que forman parte del oligómero. Esta comunicación cruzada, o *crosstalk*, puede cursar con un aumento en la unión del segundo ligando al dímero (cooperatividad positiva), lo que sucede en el homodímero de receptor de serotonina 4 (5-HT₄) (85); o un descenso en la unión de un segundo ligando al dímero (cooperatividad negativa), lo que les sucede a los homodímeros del receptor A₃ (86), de citoquinas 5 y 2 (CCR5 y CCR2), y al heterodímero CCR2-CCR5 (87).

La comunicación entre protómeros de un oligómero se refleja también en la diversidad de activación de las cascadas de señalización. Un dímero puede señalar solo a través de uno de sus dos protómeros, mientras que el protómero vecino modula su señal (**figura 11A y B**). Este es el caso del heterodímero de receptor metabotrópico de glutamato 2 (mGlu2) y mGlu4 (88), donde solo mGlu4 es capaz de activar la proteína G, pero el uso de moduladores alostéricos específicos de mGlu2 modula la señal intracelular de mGlu4. Otra posibilidad es que ambos protómeros participen activamente en la señalización, pues cada uno interacciona con su propia proteína G (**figura 11C**), o que exista una señalización

cruzada: la unión de un ligando ortostérico a uno de los protómeros del dímero altera la función del otro protómero (**figura 11D y E**). Este es el caso del oligómero del receptor metabotrópico de glutamato 1 con mGlu₂ (89).

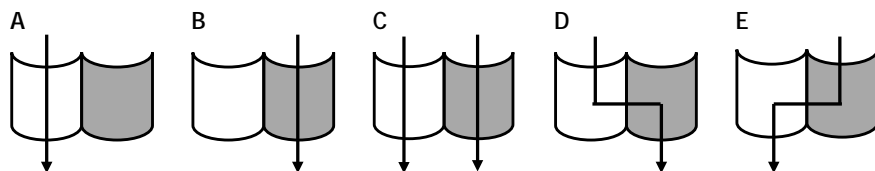


Figura 11. Múltiples modos de transmisión de la señal, desde la unión de un ligando hasta la propagación de la señal intracelular. Cada cilindro representa a un GPCR. Imagen realizada por la autora.

Todas estas propiedades que emergen de la formación de dímeros, sumadas a la relevancia fisiológica descrita de los mismos, como es el caso del heterodímero de receptores de dopamina 1 (D₁) y receptores D₂ en depresión (90), creó la necesidad del estudio de dímeros para el diseño de nuevos y mejores fármacos. Las principales técnicas disponibles para la detección de dímeros son las siguientes:

- **Coinmunoprecipitación y Western Blot.** La coinmunoprecipitación consiste en la sedimentación de un dímero con un anticuerpo específico frente a uno de los protómeros, y posterior revelado con Western Blot. Permite la detección de dímeros en tejido nativo a pesar de que la solubilización de la muestra puede destruir la interfaz dimérica (91). Se ha empleado esta técnica para la detección de homodímeros 5-HT₄ (92), o de los heterodímeros 5-HT_{1A}-5-HT_{1B} y 5-HT_{1A}-5-HT_{1D} (93). El Western Blot permite la detección de un dímero con el empleo de un anticuerpo frente a él, al detectar en el revelado una banda de mayor peso molecular. Por ejemplo, se ha empleado para la detección de dímeros del receptor M₁ (84).

- **Técnicas basadas en transferencia de fluorescencia.** Las técnicas de transmisión de energía resonante, tanto fluorescente (FRET) como bioluminiscente (BRET), permiten evaluar la proximidad entre dos proteínas. Estos sistemas están conformados por

una proteína ligada a un donante de energía, que si esta está lo suficientemente próxima al aceptor, lo excitará y este emitirá luz (94). Se han empleado técnicas de BRET para demostrar la homodimerización de los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C} (95).

Otras técnicas son la complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC) y la recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueo (FRAP). La primera es una variante del FRET en la que el fluoróforo está fragmentado en dos, y solo cuando los dos fragmentos están lo suficientemente cerca, el fluoróforo se reconstituye y es capaz de emitir luz (83); el FRAP permite el estudio de las características de difusión de los oligómeros en la membrana celular, al marcar con un fluoróforo el receptor o receptores objeto de estudio. Como ejemplos, se han empleado técnicas de BiFC y FRAP para caracterizar la heterodimerización de los receptores de neuropéptido Y subclase 1 y 2 (96).

- **Espectroscopía de correlación de fluorescencia.** La espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) es una técnica que permite cuantificar a tiempo real la movilidad de receptores marcados con moléculas fluorescentes (97). Su sensibilidad le permite distinguir entre el movimiento de moléculas de distinto tamaño, permitiendo así diferenciar entre monómeros y dímeros aun cuando los niveles de expresión son muy bajos. Así se ha demostrado la dimerización de los receptores A₃ (98), de receptores M₂ y de receptores D₁ (99).

- **Ligandos bivalentes y herramientas farmacológicas.** Permiten el estudio de dímeros en su entorno celular. Se han empleado estrategias como el uso ligandos pseudoirreversibles para la caracterización de dímeros de serotonina tipo 7 (5-HT₇) (100) o 5-HT_{2A} (101). Por otro lado, los ligandos bivalentes están formados por dos farmacóforos unidos por un espaciador de tamaño determinado, de forma que ambos farmacóforos son capaces de interaccionar con los dos protómeros del dímero. En el caso de los receptores opioides, la combinación de un agonista μ con un antagonista δ permitió reducir la tolerancia en ratones (102), lo que

demuestra la validez de esta aproximación no solo como herramienta, sino también su posible empleo en clínica.

- **Ensayo de proximidad de ligación.** El ensayo de proximidad de ligación (PLA) es un inmunoensayo que consiste en el marcaje de anticuerpos con oligonucleótidos. Al emplear dos anticuerpos específicos de los dos protómeros de un dímero y añadir una polimerasa, el ácido desoxirribonucleico (ADN) se amplifica y se puede detectar mediante un ensayo de inmunofluorescencia. Con esta aproximación se ha demostrado la heterodimerización 5-HT_{2A}-5-HT_{2C} (103), y la homodimerización del receptor de citoquinas 4 (CXCR4) (104).

3 RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS: EL RECEPTOR 5-HT_{2A}

3.1 Consideraciones generales

La serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) es una amina biógena que actúa como neurotransmisor y neuromodulador. Está implicada en procesos fisiológicos como la regulación del sueño, la memoria y la termorregulación; y patológicos como la obesidad, la depresión o la esquizofrenia (105).

Las proteínas diana de la serotonina son los receptores serotoninérgicos de los que se conocen 7 tipos, siendo todos ellos GPCRs excepto el receptor serotoninérgico tipo 3, que es un canal iónico. A su vez, estos receptores fueron clasificados en 14 subtipos, según su homología.

Los receptores de serotonina de tipo 2 comprenden tres subtipos: 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C}, acoplados principalmente a la proteína G $\alpha_{q/11}$. A pesar de que son tres receptores similares en cuanto a estructura y perfil farmacológico, no tienen ni la misma distribución en el organismo, ni idéntica funcionalidad.

La distinción de qué es lo que hace que un ligando se una con más afinidad a subtipo de receptor 5-HT₂ que a otro es vital para el desarrollo de nuevos fármacos. En general, las moléculas dirigidas

hacia el receptor 5-HT_{2A} se asocian con trastornos mentales; las dirigidas hacia el receptor 5-HT_{2B}, con trastornos cardíacos; y las dirigidas hacia el receptor 5-HT_{2C}, con trastornos metabólicos, particularmente en obesidad.

Con el objetivo de mejorar la selectividad de estos fármacos, se han tratado de identificar moléculas que se unan preferentemente a un subtipo de receptores. En esta búsqueda se han empleado paneles químicos de moléculas de distinta naturaleza (106,107). Además, se han desarrollado moléculas selectivas del receptor 5-HT_{2B} marcadas con ligandos fluorescentes como herramienta farmacológica (108).

3.2 Distribución del receptor 5-HT_{2A}

El receptor 5-HT_{2A} es el receptor objeto de estudio en la presente tesis doctoral. En humanos, es el gen 13q14-q21 el que lo codifica. Se distribuye por todo el cuerpo humano, aunque su expresión predomina en el sistema nervioso central, particularmente en corteza cerebral, bulbo olfatorio e hipocampo (**figura 12**).

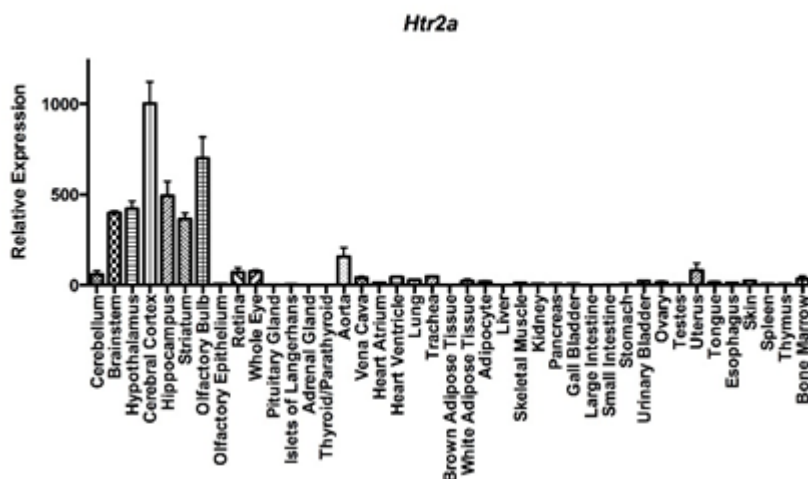


Figura 12. Medida de la expresión del gen codificante para 5-HT_{2A} en ratones. Con permiso de Elsevier (109).

En la actualidad, existen 47 fármacos disponibles en el mercado que se dirigen al receptor 5-HT_{2A} y tratan 91 enfermedades, como trastornos del sistema nervioso central (Parkinson, migraña, trastorno bipolar, ansiedad...), procesos cancerosos, trastornos del tracto digestivo (gastroparesia o dispepsia), o trastornos metabólicos, entre otros (110).

3.3 Condicionantes estructurales de la activación del receptor 5-HT_{2A}

Debido a la importancia de este receptor en procesos fisiológicos y patológicos, se han realizado múltiples estudios para tratar de caracterizar cuáles son los dominios responsables en la unión de ligandos y en la funcionalidad del receptor 5-HT_{2A} a nivel molecular, considerando su estructura aminoacídica (**figura 13**).

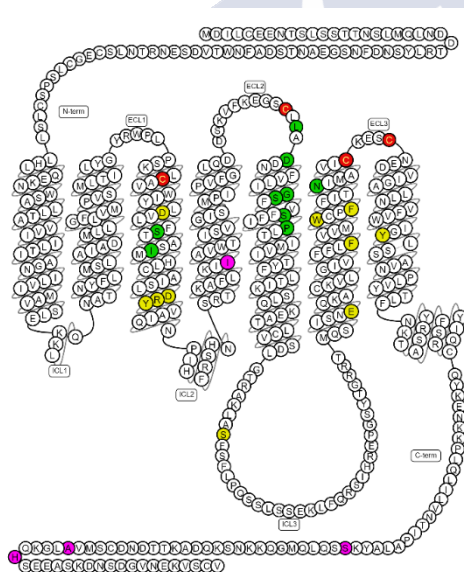


Figura 13. Secuencia aminoacídica del receptor 5-HT_{2A} humano. Se indican en color rojo las cisteínas extracelulares implicadas en puentes disulfuro; en color verde, los aminoácidos implicados en la interacción con agonistas; en color amarillo, los residuos implicados en los cambios conformacionales derivados de la activación del receptor; en color rosa, los polimorfismos de un solo nucleótido. Adaptada de (32).

En general, se puede afirmar que el bolsillo de unión ortostérico del receptor 5-HT_{2A} tiene cargas negativas que facilitan la interacción con aminas biógenas. El cribado virtual realizado por Gandhimathi y colaboradores empleando la conformación activa del receptor β_2 como modelo consiguió identificar tres residuos implicados en la unión de agonistas al receptor 5-HT_{2A} (**figura 13**; coloración verde): el aspartato D231^{5,35}, la serina S239^{5,43} y la asparagina N343^{6,55} (111).

Además de estos residuos, Almaula y colaboradores propusieron que la serina S159^{3,36} interacciona con serotonina pero no con LSD (112), y Ebersole y colaboradores extendieron esta teoría, reafirmando la interacción S159^{3,36} y S242^{5,46} con serotonina y (\pm)2,5-Dimetoxi-4-iodoanfetamina ((\pm)DOI) (**figura 13**, coloración verde) a través de un puente de hidrógeno entre serinas y el nitrógeno no sustituido de la indolamina. Esto no es posible para LSD, pues el nitrógeno está sustituido (113). La interacción de los agonistas con distintos residuos facilita la estabilización de distintas conformaciones activas del receptor.

Como resultado de las múltiples conformaciones que adopta, el receptor 5-HT_{2A} puede activar distintas vías de señalización de forma selectiva. Estudios de *modelling* demostraron que son dos los residuos clave en este proceso, dentro del bolsillo de unión ortostérico del receptor: S242^{5,46} y N343^{6,55} (**figura 13**, coloración verde): el primero relacionado con la vía de señalización mediada por la proteína G_{q/11} y el segundo relacionado con la vía de señalización mediada por la proteína G_{12/13} (114).

Además, se ha descrito la importancia del ECL-2 en la unión de ligandos. Basándose en el cristal del receptor 5-HT_{2B} unido a LSD, se comprobó que el ECL-2 se comporta como una tapa al situarse sobre el bolsillo de unión ortostérico, tanto en el receptor 5-HT_{2A} como en el receptor 5-HT_{2B}. Para el receptor 5-HT_{2A}, la mutación leucina L229A^{ECL-2} aumenta la constante de disociación de LSD (**figura 13**, coloración verde). Como consecuencia, el LSD reduce la internalización del receptor por β -arrestinas sin alterar la movilización de calcio (64). Es por ello por lo que L229A^{ECL-2} en el ECL-2 emerge

como un residuo clave en la selectividad funcional del LSD por dicho receptor.

En cuanto a ligandos antagonistas, estudios de acoplamiento molecular demostraron que los puntos de interacción de antipsicóticos típicos y atípicos con el receptor 5-HT_{2A} no coinciden, sino que son adyacentes (115). Esto corrobora la estabilización de distintas conformaciones inactivas por parte de antipsicóticos típicos y atípicos.

A nivel intracelular, se ha propuesto que el ICL-2 puede adoptar dos conformaciones: tras la unión de agonistas alucinógenos como el (±)DOI o el LSD, el ICL-2 se posiciona hacia fuera del receptor; tras la unión de agonistas no alucinógenos como la serotonina, el ICL-2 se posiciona hacia dentro del receptor (116). De nuevo, distintos agonistas estabilizan distintas conformaciones activas que serán más afines por una vía de señalización que por otra.

Otro bucle intracelular implicado en la estabilización de distintas conformaciones activas es el ICL-3, que participa en la fosforilación del receptor. En particular, la serina S280^{ICL-3} (**figura 13**, coloración amarilla) participa en la fosforilación del receptor tras la unión de ligandos alucinógenos pero no tras la unión de no alucinógenos, por lo que Karaki y colaboradores propusieron que este residuo también era clave en la selectividad funcional del receptor 5-HT_{2A} (117).

La comunicación entre el extremo extracelular del receptor y el extremo intracelular sucede a partir de unos micro ajustes en los dominios transmembrana, que traducen la señal extracelular en una respuesta. La dinámica de activación del receptor 5-HT_{2A} comienza con la unión de un ligando agonista, que implica un cambio de orientación de TM-6, como sucede en cualquier GPCR. Como consecuencia, la cerradura iónica entre el motivo DRY y E318^{6.30} (**figura 13**, coloración amarilla) se rompe, lo que permite que W336^{6.48} rote de perpendicular a paralelo, y se forme una doble interacción π - π entre los residuos fenilalanina F332^{6.44} y F339^{6.51} (**figura 13**, coloración amarilla). Como consecuencia, se abre el ángulo intracelular formado entre el TM-7 y la H8, y se produce el acoplamiento a la proteína efectora (118) (**figura 14**).

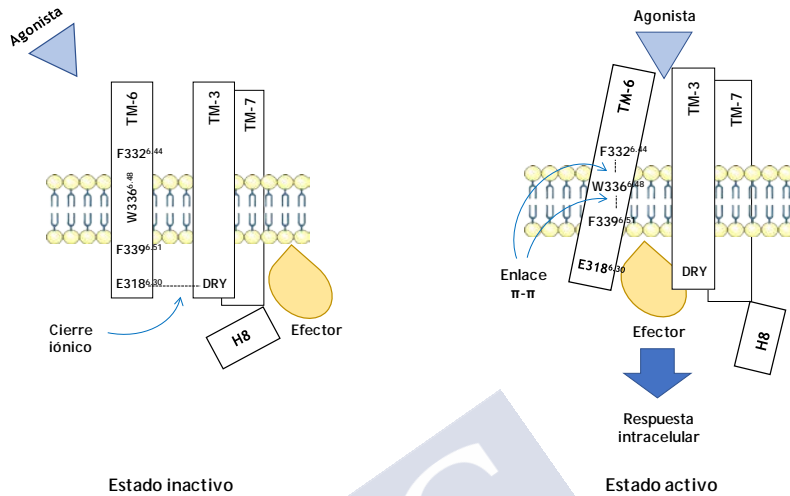


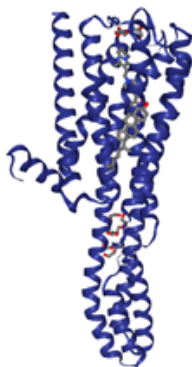
Figura 14. Esquema de activación del receptor 5-HT_{2A}. Imagen realizada por la autora.

Cabe destacar que, para este receptor, se han descrito siete polimorfismos de un solo nucleótido, dos de los cuales son silentes y no se traducen en un cambio de aminoácido (**figura 13**, coloración rosa). El más frecuente es H452Y^{C-term}, presente en el 9,3 % de los alelos codificantes de 5-HT_{2A}. Esta mutación altera la formación de complejos con otros receptores (119).

Con respecto a las variantes I197V^{4.47}, alanina A447V^{C-term} y S421F^{C-term}, se ha estudiado el comportamiento de agonistas y antagonistas, tras medir la respuesta a calcio, y se ha visto que estas variantes condicionan la respuesta a antipsicóticos (120).

Recientemente, se ha cristalizado el receptor 5-HT_{2A} de serotonina con risperidona y zotepina, lo que permitió la identificación de las características estructurales que definen la interacción con ligandos de una manera más precisa (**figura 15**).

A



B



Figura 15. Estructura cristalina del receptor 5-HT_{2A} en presencia de risperidona (PDB6A93; (121)) visto desde un lateral (A) o desde arriba (B).

El cristal del receptor confirmó la presencia del puente disulfuro entre TM-3 y ECL-2, formado entre C148^{3.25} y C227^{ECL-2} (121), que establece conexiones con W141^{ECL-1} para ajustar el bolsillo de unión extendido, característico de los receptores serotoninérgicos.

En cuanto al bolsillo de unión ortostérico, este se caracteriza por ser profundo y de naturaleza hidrofóbica. En él participan residuos como W336^{6.48}, F332^{6.44}, I163^{3.40} y P246^{5.50}, además del puente salino que se forma entre D155^{3.32} y Y370^{7.43}. El residuo G238^{5.42} actúa como punto de conexión entre el bolsillo de unión ortostérico y el bolsillo de unión extendido, único del receptor 5-HT_{2A} (**figura 16**).

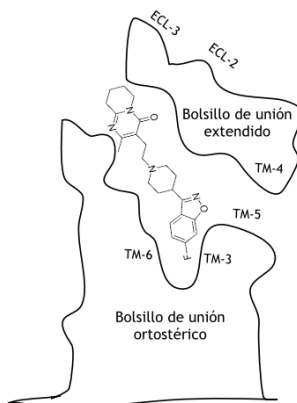


Figura 16. Esquema de interacción de la risperidona con el bolsillo de unión ortostérico y el bolsillo de unión extendido del receptor 5-HT_{2A}. Imagen realizada por la autora a partir de Kimura *et al.*, 2019.

3.4 Señalización intracelular del receptor 5-HT_{2A}

Las múltiples conformaciones activas del receptor 5-HT_{2A} implican la activación de numerosas cascadas de señalización intracelular, mediadas por distintas proteínas G, además de la vía independiente de proteína G.

El receptor 5-HT_{2A} se acopla, entre otras, a la proteína G_{αq/11} para activar la fosfolipasa C (PLC), que hidroliza el fosfolípido de membrana fosfatidilinositol difosfato (PIP₂) en diacilglicerol (DAG) e inositol fosfato. El DAG es un diacilglicérido lipofílico que actúa como segundo mensajero, y que, junto con calcio, activa la proteína quinasa C (PKC), responsable de la desensibilización del receptor (122). El inositol liberado puede estar mono fosforilado (inositol monofosfato), difosforilado (inositol difosfato) y trifosforilado (inositol trifosfato). Las tres especies (IPs) se encuentran en un equilibrio dentro de la célula, formando el ciclo de los inositoles. La enzima inositol mono fosfatasa, que es inhibida por litio, reconvierte el inositol trifosforilado en PIP₂. Los IPs actúan como mensajeros al abrir los canales de calcio del retículo endoplasmático (RE), que aumentan los niveles de calcio citosólicos (**figura 17**). Además, la

activación de G_{q/11} activa la proteína Ras, que a su vez actúa sobre Raf para terminar con la fosforilación de ERK (105).

La activación de la proteína $G_{q/11}$ es la principal vía de activación del receptor 5-HT_{2A}, pero además tiene la capacidad de activar $G_{12/13}$ y $G_{i/o}$. La activación de $G_{\alpha_{12/13}}$ promueve la activación de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) mediante la proteína Rho, que activa la quinasa p38. La PLA₂ hidroliza fosfolípidos de membrana a ácido araquidónico (AA), mediador liposoluble (105). La activación de $G_{i/o}$ produce, a través de las subunidades $\beta\gamma$, la activación de la proteína Src, que activa la fosforilación de ERK de igual manera que $G_{q/11}$ (123) (**figura 17**).

Se ha descrito, además, que el receptor 5-HT_{2A} tiene una activación independiente de proteína G mediada por β-arrestina 2, que interviene en la desensibilización del receptor y la activación de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K).

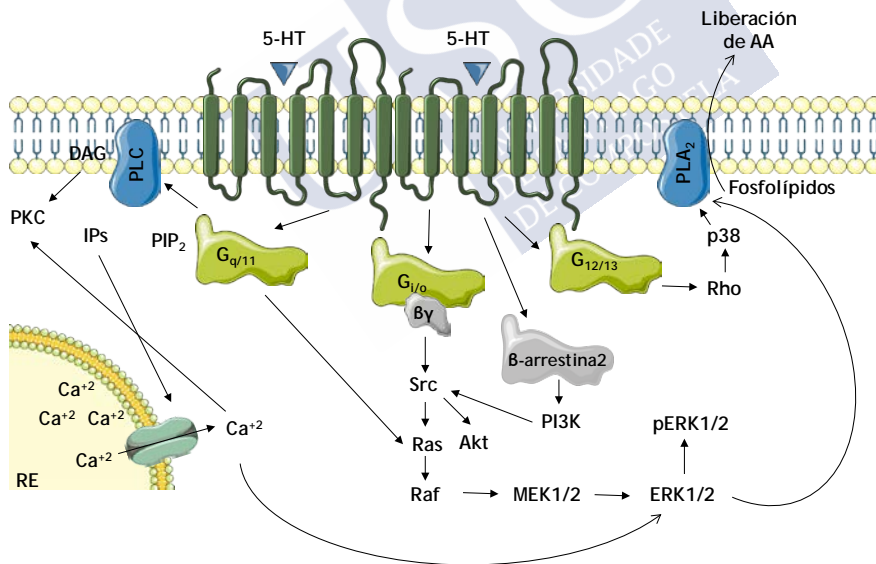


Figura 17. Esquema simplificado de las vías de señalización intracelular del receptor 5-HT_{2A}. Imagen realizada por la autora.

Cada ligando poseerá una capacidad única de inducir la micro activación de este receptor, de activar una cascada de señalización u otra preferencialmente y, por tanto, presentará selectividad funcional.

La activación diferencial de la PLC y PLA₂ fue la primera en describirse para el receptor 5-HT_{2A}. Berg y colaboradores demostraron que las vías PLC (vía de IPs) y PLA₂ (vía de AA) la eficacia inducida por ligandos como (±)DOI y LSD en ambas vías de señalización era distinta (124). Son dos vías de señalización independientes, en las que no existe relación directa entre la estructura del ligando y la vía de activación preferencial (125). Así, LSD y quipazina son agonistas sesgados hacia la vía de AA, mientras que 5-HT, lisurida o psilocibina están sesgados hacia la vía de IPs (126). La extensión del estudio de esta activación diferencial a derivados alucinógenos de fenilisoprenalina y feniletilamina reveló que se pueden diseñar moléculas que activen la PLC de distinta forma que la PLA₂ (127).

El estudio con moléculas antagonistas evidenció que estas también son capaces de estabilizar distintas conformaciones inactivas del receptor (128). En particular, la clozapina antagoniza la estimulación por serotonina formando una curva dosis-respuesta monofásica en la vía de IPs, mientras que la curva es bifásica en la vía de AA, lo que no sucede con haloperidol (129).

Con respecto a la activación diferencial entre la vía dependiente de proteína G y la vía independiente de proteína G, se ha descrito que la serotonina induce la internalización mediada por β-arrestinas, mientras que el (±)DOI y la clozapina no. Tanto la serotonina como la clozapina fosforilan la proteína quinasa AKT citoplasmática, pero de distinta forma: mientras que la serotonina lo hace a través de β-arrestinas con la participación de Src, la clozapina lo hace de manera independiente. Tras el tratamiento con clozapina *in vivo*, la locomoción basal de ratones está disminuida y, de nuevo, esto es independiente de arrestinas (130).

Además, la fosforilación de ERK inducida por clozapina es distinta a la inducida por haloperidol. Pereira y colaboradores evaluaron el efecto en la fosforilación de ERK en la PFC y estriado de

ratones tratados durante 24 h con clozapina o haloperidol. Como resultado, el tratamiento agudo con clozapina disminuyó la fosforilación de ERK, mientras que el crónico la aumentó. No obstante, el haloperidol mantuvo en ambos tratamientos la fosforilación elevada de ERK en el estriado y disminuida en la PFC (27).

Se ha descrito la capacidad de distintos ligandos en la regulación de la expresión del receptor 5-HT_{2A}. Al cuantificarse los niveles de expresión de dicho receptor en la PFC de ratones tras la administración crónica de clozapina y haloperidol en ratones, se ha visto que la clozapina disminuye la expresión del receptor 5-HT_{2A} en la PFC de ratones, mientras que el haloperidol no (131).

Al estudiar el efecto en la expresión de 5-HT_{2A} en la corteza cerebral de ratones tratados entre 1 y 21 días con clozapina, la expresión de este receptor descende entre el día 1 y el 14, si bien a los 21 días de tratamiento, los niveles se reestablecen a valores similares a los de ratones no tratados. Este descenso en la expresión del receptor se corresponde con una respuesta de contracción de cabeza (*head twitch*) a LSD: el número de *head twitch* se reduce junto con la reducción de la expresión del receptor 5-HT_{2A} y, de nuevo, se reestablecen a los 21 días (132). Estudios *ex vivo* con pacientes esquizofrénicos no tratados y tratados con clozapina revelan que la clozapina revierte la elevada expresión del receptor 5-HT_{2A} que se observa en esta enfermedad (133).

En función del ligando empleado, la endocitosis, la fosforilación y el reciclaje del receptor cambia. El estudio del receptor 5-HT_{2A} en células de riñón embrionarias humanas reveló que la serotonina, el (±)DOI y la clozapina inducen internalización del receptor, y esta es mediada por PKC en el caso de serotonina y (±)DOI, pero no en el caso de la clozapina (134). De nuevo, un comportamiento diferencial que demuestra la selectividad funcional de este receptor.

También es posible evaluar el agonismo sesgado a nivel de expresión génica. Se ha descrito que la estimulación con ligandos alucinógenos revela un transcriptoma de las vías de señalización

activadas distinto al de no alucinógenos, al estudiar el comportamiento de ambos tipos de agonistas en el córtex somatosensorial de ratones (135).

Distinta a la selectividad funcional es la señalización cruzada. Este término se refiere a la capacidad de un receptor de alterar la cascada de señalización de otro, sin necesidad de que exista una interacción entre ellos, y también existe en el receptor 5-HT_{2A}.

En un sistema en el que estén presentes los receptores 5-HT_{2B} y 5-HT_{1B}, la activación de 5-HT_{2B} induce la activación de PLA₂ y, como consecuencia, la señalización a través de la enzima adenilato ciclasa de 5-HT_{1B} se inhibe. En presencia de 5-HT_{2A}, esta inhibición desaparece (136). Otro ejemplo surge entre los receptores MOR y 5-HT_{2A}: la activación del receptor 5-HT_{2A} acelera la internalización de MOR ligado a DAMGO, a través de PKC (137).

3.5 Dimerización del receptor 5-HT_{2A}

El receptor 5-HT_{2A} existe en forma homodimérica, lo que se confirmó mediante estudios de FRET y coimmunoprecipitación, y como consecuencia de la homodimerización, la clozapina produce un efecto de cooperatividad negativa entre ambos protómeros del dímero, para la vía de señalización dependiente de la PLA₂ (129). Esta habilidad del homodímero se empleó para el estudio de la contribución de cada uno de los protómeros en la señalización intracelular.

Iglesias y colaboradores (101) emplearon una aproximación farmacológica para el estudio de dímeros: los ligandos pseudoirreversibles, técnica empleada anteriormente por Teitler y colaboradores en la caracterización del homodímero 5-HT₇-5-HT₇ (100,138,139). Un ligando pseudoirreversible es un ligando que se une al receptor con una cinética de disociación muy lenta. La ritanserina ejerce este efecto en el receptor 5-HT_{2A}.

El empleo de ritanserina en homodímeros 5-HT_{2A}-5-HT_{2A} con cooperatividad negativa demostró que existe una comunicación

alostérica entre los dos protómeros del dímero, pues la espiperona, un antagonista competitivo, es capaz de acelerar la cinética de disociación de la ritanserina al ligarse al protómero vecino. En el caso de que uno de los dos protómeros del dímero estén bloqueados por ritanserina, el homodímero no es capaz de producir una señal en presencia de un agonista, ni mediada por la PLC ni mediada por la PLA_2 (101). Es por ello por lo que se concluye que son necesarios ambos protómeros del homodímero para señalar.

Además, se ha demostrado la homodimerización del receptor 5-HT_{2A} por dinámica molecular (140), a través de una interfaz dimérica asimétrica entre los dominios TM-4 y TM-5. La cercanía de la interfaz dimérica y el bolsillo de unión ortostérico de ambos protómeros permite que exista cooperatividad alostérica entre ellos, de modo que un bolsillo de unión puede modificar la afinidad de un ligando por el otro. Debido a que el ICL-2 está implicado en selectividad funcional, se propuso también como parte de la interfaz dimérica (116).

Además, se ha planteado la posibilidad de que las propiedades del oligómero difieran en función del ligando empleado, debido a que distintos ligandos puedan estabilizar distintas interfaces de dimerización. Estudios de simulación computacional propusieron que la interfaz dimérica del receptor ligado al LSD implica a los TM-4 y TM-5 principalmente, mientras que la interfaz dimérica del receptor ligado a ketanserina implica además al TM-1 (118). Por otro lado, estudios de FRET demostraron que en presencia de clozapina y haloperidol, la eficiencia de FRET entre protómeros del receptor 5-HT_{2A} decrece, y que por lo tanto, existe un cambio de disposición en los dos protómeros al ligar cualquiera de estos dos antagonistas (119).

Como herramienta farmacológica para el estudio de los homodímeros 5-HT_{2A}-5-HT_{2A} se desarrollaron los antagonistas homobivalentes. Una vez optimizado el espaciador, se demostró su capacidad de bloquear la respuesta de ERK *in vitro* y la actividad locomotora inducida por cocaína en ratas (141). Hoy en día, todavía

no se han desarrollado moléculas homobivalentes o heterobivalentes de uso clínico.

Con respecto a la interacción con otros receptores, el receptor 5-HT_{2A} se ha descrito que forma heterodímeros con el receptor de dopamina D₂, el receptor mGlu2, el receptor 5-HT_{1A}, el receptor cannabinoide 1, CB1, con subtipos 5-HT₂, etc.

Albizu y colaboradores caracterizaron el heterodímero 5-HT_{2A}-D₂ en células transfectadas y la PFC de ratón. La simple presencia del receptor D₂ incrementa la afinidad de (±)DOI por el receptor 5-HT_{2A}. Este heterodímero, que presenta cooperatividad positiva, podría ser fundamental en el tratamiento de la esquizofrenia (142).

La heterodimerización del receptor mGlu2 con el receptor 5-HT_{2A} implica la interacción de ambas parejas de homodímeros para formar un complejo de cuatro protómeros (143), en donde cada protómero es capaz de unir ligandos y participa en la modulación alostérica del resto. Estudios en ratones demostraron que la ausencia del receptor mGlu2 implica la desaparición del *head twitch* inducido por (±)DOI y LSD. Además, la cooperatividad en este heterocomplejo está alterada en corteza prefrontal de pacientes con esquizofrenia (144). Al evaluar los niveles de 5-HT_{2A} y mGlu2 en la PFC de pacientes esquizofrénicos, los primeros están aumentados y los segundos disminuidos con respecto a la normalidad (133).

Otro heterodímero que se ha descrito hasta la fecha es el formado por los receptores 5-HT_{1A}-5-HT_{2A} (145), en células piramidales del hipocampo, mediante ensayos de PLA. Como consecuencia de la activación del receptor 5-HT_{2A} por un agonista, los residuos transmembrana se reajustan, dando lugar a una comunicación alostérica entre protómeros. Este *crosstalk* se traduce en una afinidad reducida del receptor 5-HT_{1A} por antagonistas, lo que podría tener relevancia a la hora del diseño de nuevos fármacos.

Se ha descrito la formación de un heterodímero entre los receptores CB1 y 5-HT_{2A}. El receptor CB1 está implicado en dolor. Fármacos como tetrahidrocannabinol (THC) no se usan en tratamiento

del dolor debido a la pérdida de memoria que producen, cuya causa se desconoce. Viñals y colaboradores demostraron con ensayos de BRET la heterodimerización CB1-5-HT_{2A}, presente en estriado y la PFC. Estudios en ratones demostraron que THC no produce pérdida de memoria en ratones que no expresan el receptor 5-HT_{2A}. A consecuencia de la dimerización, el agonista alucinógeno (\pm)DOI señala vía G_i en lugar de vía G_q en presencia del receptor CB1 (146).

De nuevo, mediante BRET se demostró la heterodimerización 5-HT_{2A}-5-HT_{2B} y 5-HT_{2A}-5-HT_{2C}, a pesar de que la homodimerización predomina sobre la heterodimerización (95). En el heterocomplejo 5-HT_{2A}-5-HT_{2C}, 5-HT_{2C} es capaz de anular la respuesta de 5-HT_{2A}, con lo que se deduce que el receptor 5-HT_{2C} predomina en acción sobre los otros subtipos de receptores serotoninérgicos.





JUSTIFICACIÓN



JUSTIFICACIÓN

El receptor 5-HT_{2A} es un GPCR de clase A que, a pesar de que se encuentra ampliamente distribuido por el cuerpo humano, tiene una expresión predominante en el SNC (110), lo que lo convierte en la diana numerosos fármacos implicados en trastornos del SNC. La introducción de los denominados fármacos antipsicóticos atípicos supuso la inclusión del antagonismo 5-HT_{2A} en el efecto antipsicótico (12): el bloqueo de receptores D₂ no es suficiente, como revela el tratamiento con antipsicóticos clásicos o típicos, sino que un bloqueo 5-HT_{2A} mejora la sintomatología de la enfermedad. Dado que en la actualidad los fármacos disponibles para tratar la esquizofrenia son ineficaces y desencadenan numerosos efectos adversos, la comprensión de la farmacología del receptor 5-HT_{2A} se convirtió en un objetivo primordial en el desarrollo racional de nuevos fármacos antipsicóticos.

El receptor 5-HT_{2A} presenta una farmacología compleja. A nivel intracelular se acopla, entre otras, a la proteína G_{q/11} que activa la PLC (105). Hoy día, se sabe que un ligando puede estabilizar múltiples estados conformacionales de GPCRs, con distintas consecuencias a nivel intracelular (43). En particular, la estabilización de distintas conformaciones activas del receptor 5-HT_{2A} conlleva a la activación diferencial de dos o más vías de señalización, fenómeno que se conoce como selectividad funcional o agonismo sesgado (114), de forma que se estimulan la PLC y también la PLA₂ (124).

Además, el receptor 5-HT_{2A} existe en forma homodimérica, siendo el homodímero la mínima unidad funcional para su actividad farmacológica (101). Una consecuencia de esta naturaleza homodimérica es la cooperatividad que existe entre los dos protómeros del homodímero: la unión de un ligando a uno de los protómeros del homodímero condiciona la unión de un segundo ligando, lo que se refleja en una señalización intracelular modificada (129).

Pese a todo este conocimiento, actualmente se desconocen cuáles son los determinantes estructurales en la activación e inactivación farmacológica del receptor 5-HT_{2A}. Recientemente, este receptor se cristalizó en presencia de los antagonistas risperidona y zotepina (121), lo que permitió precisar qué aminoácidos participan en la unión de ligandos al receptor. Se identificaron dos regiones críticas en la unión de ligandos: el bolsillo de unión ortostérico, que se sitúa entre TM-3 y TM-6, y el bolsillo de unión extendido, que abarca TM-4, ECL-2 y ECL-3. Los dominios TM-3 y ECL-2, se mantienen unidos mediante un puente disulfuro extracelular, conservado en más del 90 % de GPCRs (57,63), al enlazarse la cisteína C148^{3,25} con la cisteína C227^{ECL-2}. Además, existe la posibilidad de la formación de otro puente disulfuro extracelular intra-hélice ECL-3 (147,148).

En otros GPCRs, se ha propuesto que los puentes disulfuro extracelulares podrían condicionar el estado activo o inactivo de los mismos (149). Además, en el reconocimiento de ligandos por el receptor 5-HT_{2A} participan los dominios TM-3, ECL-2 y ECL-3, entre otros. Por todo ello, el conocimiento de la implicación de los puentes disulfuro extracelulares en la estabilización de las distintas conformaciones de dicho receptor podría esclarecer su farmacología.



ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



ANTECEDENTES

- El ditioneitol (DTT) es un agente redox que se emplea para reducir los residuos tiol de las cisteínas presentes en las proteínas, y así romper puentes disulfuro de manera inespecífica. Ha sido empleado para el estudio del efecto de los puentes disulfuro extracelulares en el receptor 5-HT_{2A} nativo (150). Iglesias y colaboradores emplearon un tratamiento de DTT 20 mM durante 10 min a 37 °C en células que expresan el receptor 5-HT_{2A} humano, para evaluar la unión del radioligando agonista [³H]LSD y la señalización intracelular medida a través de dos vías de señalización no interconectadas: PLC y PLA₂. Se observó que el tratamiento con DTT redujo el marcaje específico de receptores con [³H]LSD, sin alterar ni las constantes en el equilibrio ni las constantes cinéticas. Sin embargo, no se dispone de datos que muestren el efecto de esta reducción inespecífica de puentes disulfuro extracelulares en la unión de ligandos antagonistas como [³H]Ketanserina al receptor 5-HT_{2A} nativo.
- A nivel de activación del receptor 5-HT_{2A}, el tratamiento con DTT 20 mM de células que expresan dicho receptor redujo la señalización intracelular inducida por serotonina en dos vías de señalización no interconectadas: PLC y PLA₂, sin alterar la cooperatividad entre ambos protómeros del homodímero (150). El receptor 5-HT_{2A} puede adoptar múltiples conformaciones activas e inactivas, de forma que cada ligando puede estabilizar una conformación determinada del receptor. A pesar de que se conoce cuál es el efecto de los puentes disulfuro extracelulares en la activación de dicho receptor mediada por serotonina, no se dispone de estudios que evalúen cuál es el efecto del DTT en la señalización de otros ligandos agonistas, así como el efecto del DTT en la inhibición de ligandos antagonistas.

- Recientemente, el cristal del receptor 5-HT_{2A} ha sido resuelto en presencia de los fármacos antipsicóticos risperidona y zotepina (121), lo que reveló la presencia de un puente disulfuro extracelular establecido entre las cisteínas C148^{3,25} y C227^{ECL-2}. Los dominios a los que pertenecen estas cisteínas están ampliamente implicados en la activación de GPCRs: por un lado TM-3, cuyo esqueleto rota para favorecer la interacción con las proteínas transductoras de la señal a nivel intracelular (57,71,118); por otro lado, el ECL-2 juega un papel en la acomodación de ligandos (64), así como en su reconocimiento (58), la activación diferencial de vías de señalización (62) e incluso alosterismo (151). Para el estudio de la implicación de dicho puente disulfuro en la unión de ligandos previa resolución del cristal, se realizaron simulaciones *in silico* con el cristal del receptor 5-HT_{2B} como modelo. Estas simulaciones muestran que el LSD no puede acomodarse en el bolsillo de unión ortostérico del receptor 5-HT_{2A} cuando el ECL-2 y TM-3 no están anclados a través del puente disulfuro C148^{3,25}-C227^{ECL-2} (150). Aunque la resolución del cristal del receptor 5-HT_{2A} indica que este enlace juega un papel importante en la unión de ligandos, hasta el momento no se ha confirmado *in vitro* su relevancia farmacológica en el receptor 5-HT_{2A} humano.
- En otros GPCRs se ha descrito que la generación de receptores recombinantes modifica las propiedades del GPCR nativo. De la alteración del esqueleto aminoácido del GPCR deriva la estabilización de conformaciones aberrantes, que pueden alterar la migración a la membrana celular del receptor. Así, la mutación de cisteínas implicadas en el establecimiento de puentes disulfuro implica un tráfico a membrana celular truncado en numerosos GPCRs: en el receptor GPR39 se ha descrito que la sustitución de las cisteínas C^{3,25}-C^{ECL-2} reduce la localización en membrana del receptor en más de un 80 %

(66); en los receptores de citoquinas CCR1 y CCR5, esta sustitución supone una disminución de la localización en membrana celular del receptor en más de un 85% (152); en el receptor A₁, estas mutaciones impiden el tráfico a membrana celular del receptor (153). Una de las causas de este tráfico alterado podría ser la retención en el retículo endoplasmático, pues este orgánulo actúa como punto de control intracelular del correcto plegamiento de proteínas. La simple mutación de un aminoácido puede estabilizar conformaciones aberrantes del receptor, haciendo que estos queden retenidos en retículo endoplasmático (154). En cuanto al receptor 5-HT_{2A}, los estudios con DTT permiten la reducción inespecífica de los puentes disulfuro extracelulares del receptor nativo presente en la membrana celular, pero se desconoce cuál es el papel del puente disulfuro C148^{3.25}-C227^{ECL-2} en la migración a membrana del receptor 5-HT_{2A} humano.

- Se considera que la unidad mínima funcional del receptor 5-HT_{2A} es el homodímero (101), y que la interfaz homodimérica compromete los dominios TM-4 y TM-5 (140). Los puentes disulfuro extracelulares participan en la estabilización de conformaciones activas e inactivas de GPCRs y, en algunos casos, forman parte de la interfaz dimérica (92,153). Aunque estudios previos proponen que la rotura inespecífica de puentes disulfuro extracelulares del receptor 5-HT_{2A} nativo no altera su naturaleza homodimérica (150), hasta la fecha se desconoce si el puente disulfuro C148^{3.25}-C227^{ECL-2} en particular participa en la estabilización de conformaciones favorables a la homodimerización de dicho receptor.

HIPÓTESIS

Los puentes disulfuro extracelulares, y particularmente el enlace que se establece entre las cisteínas C148^{3,25} y C227^{ECL-2}, podrían condicionar la farmacología antipsicótica del receptor 5-HT_{2A} homodimérico.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la implicación de los puentes disulfuro extracelulares, y en particular, del enlace establecido entre las cisteínas C148^{3,25} y C227^{ECL-2} en la farmacología antipsicótica del receptor 5-HT_{2A} humano homodimérico.

Objetivos específicos

1. Comprobar la implicación de los puentes disulfuro extracelulares en la farmacología del receptor 5-HT_{2A} nativo.

2. Desarrollar un modelo experimental que permita el estudio del puente disulfuro C148^{3,25}-C227^{ECL-2} en receptor 5-HT_{2A}, mediante técnicas de mutagénesis dirigida.

3. Caracterizar el papel del puente disulfuro C148^{3,25}-C227^{ECL-2} en el receptor 5-HT_{2A} a distintos niveles.

3.1. Estudiar la farmacología del receptor 5-HT_{2A} recombinante.

3.2. Evaluar el tráfico a la membrana celular del receptor 5-HT_{2A} humano recombinante.

3.3. Comprobar el estado homodimérico del receptor 5-HT_{2A} humano recombinante.



MATERIAL Y MÉTODOS



MATERIAL

1 REACTIVOS EMPLEADOS EN CULTIVO CELULAR

1.1 Tampones y reactivos generales

Se emplearon tampón fosfato salino (*phosphate buffer saline*, PBS, NaCl 140 mM, KH_2PO_4 2 mM, NaH_2PO_4 10 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4), dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich), poli-D-lisina (Sigma Aldrich), tripsina suplementado con ácido etildiaminotetracético (EDTA) (Sigma Aldrich).

1.2 Línea celular CHO-K1

Las células de ovario de hámster chino (*Chinese Hamster Ovary*) CHO-K1 son un subclon de las células de ovario de hámster chino CHO originales. Se cultivaron en medio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium-F12* (DMEM-F12, Gibco), suplementado con L-glutamina al 5 % (Sigma Aldrich), penicilina-estreptomicina al 1 % (Sigma Aldrich) y suero bovino fetal (FBS, Sigma Aldrich) al 10 %.

1.3 Línea celular CHO-K1 5-HT_{2A}

Las células CHO-K1 5-HT_{2A} fueron cedidas por el Dr. William P Clarke de la Universidad de San Antonio (Texas). Son células CHO que expresan de forma estable el receptor 5-HT_{2A}, a una densidad de, aproximadamente, 200 fmol/mg de proteína (155), densidad similar a la fisiológica en cerebro humano (156). Se cultivaron en el medio de las células CHO-K1, suplementado con higromicina B a una concentración 0,3 mg/ml (Thermo-Fisher), antibiótico de selección para dicho receptor.

1.4 Línea celular HEK293

Las células de riñón humano (*human embrionic kidney*) HEK293 se cultivaron en medio DMEM (Gibco), suplementado con FBS al 10 % y penicilina-estreptomicina al 1 %.

1.5 Línea celular HEK293T/17

Línea comercial de ATCC, es una variante de las células HEK293, modificadas para conseguir eficiencias de transfección elevadas. Se cultivaron en medio DMEM alto en glucosa (4,5 %), suplementado con FBS al 10 %, Glutamax[®] (Gibco) al 5 % y de penicilina-estreptomicina al 1 %.

1.6 Línea celular Flp-In[™] T-REx 293

Las células Flp-In[™] T-REx[™] 293 están diseñadas para una rápida generación de líneas estables, garantizando una expresión homogénea de una proteína de interés desde un vector de expresión Flp-In[™]. Cedidas por el Doctor Juan F. López Giménez (Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”, CSIC, Granada), se cultivaron en DMEM alto en glucosa y libre de piruvato (Sigma Aldrich), suplementado con Glutamax[®] al 1 %, penicilina-estreptomicina al 1 %, FBS libre de tetraciclinas (Gibco) al 10 %, blasticidina a una concentración 5 µg/ml de (InvivoGen) y zeocina 100 µg/ml (Thermo-Fisher).

1.7 Línea celular Flp-In[™] T-REx[™] 293-GPCR

A partir de la anterior línea celular, se generaron cuatro líneas estables para su empleo en la presente tesis doctoral. Su medio de cultivo consistió en DMEM alto en glucosa y libre de piruvato, suplementado con Glutamax[®] al 1 %, penicilina-estreptomicina al 1 %, FBS libre de tetraciclinas al 10 %, blasticidina 5 µg/ml e higromicina B 200 µg/ml.

2 REACTIVOS EMPLEADOS EN ENSAYOS FARMACOLÓGICOS

El DTT, la polietilenimina (PEI), el ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES), la Solución Salina Tamponada de Hank (HBSS) y la doxiciclina fueron suministrados por Sigma Aldrich. El Opti-MEM[®] fue suministrado por Thermo-Fisher.

Las sales empleadas en tampones de ensayo, LiCl, NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, Trizma[®] base fueron suministradas por Sigma Aldrich.

El Fura-2 QBT[™] *Calcium Kit* fue suministrado por Molecular Devices. El Probenecid fue suministrado por Thermo-Fisher.

Los radioligandos [³H]myo-inositol (20,3 Ci/mmol), [³H]LSD (82,9 Ci/mmol) y [³H]Ketanserina (47,3 Ci/mmol), así como las placas flexibles *Flexiplat*, el líquido de centelleo *OptiPhase[®] Supermix cocktail*, la película selladora de microplacas transparente, las *RNA YSi Binding SPA Beads* fueron suministrados por Perkin Elmer. El líquido de centelleo *Universol[™]* fue suministrado por Thermo-Fisher. Las placas GF/B fueron suministradas por Millipore.

El ácido fórmico al 98 % y el etanol absoluto fueron suministrados por Panreac. La albúmina de suero bovino (BSA) fue suministrada por Roche.

El paraformaldehído (PFA), Hoechst 33342 *dye*, ER-Tracker[™] *dye* fueron suministrados por Thermo-Fisher (Invitrogen). El reactivo de Bradford *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* fue suministrado por Bio-Rad.

La coelenterazina h y la lipofectamina (*Lipofectamine LTX and plus reagent*) fueron suministrada por Thermo-Fisher (Invitrogen).

3 REACTIVOS FARMACOLÓGICOS

La serotonina (5-HT), (±)2,5-dimetoxi-4-iodoanfetamina ((±)DOI), dimetilamida del ácido lisérgico (LSD), clozapina, haloperidol, metisergida, risperidona, ritanserina, risperidona y SB269970 fueron suministrados por Sigma Aldrich.

4 REACTIVOS EMPLEADOS EN TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Las enzimas de restricción y el kit de extracción de ADN *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* fueron suministrados por ThermoFisher Scientific. El kit de extracción de ADN *NucleoBond® Xtra Midi EF* fue suministrado por Macherey-Nagel; *GeneJet Plasmid Miniprep kit* fue suministrado por Thermo Scientific. El kit de mutagénesis dirigida *QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* fue suministrado por Agilent Technologies. La solución de tinción de ácidos nucleicos *RedSafe™* fue suministrada por iNtRON biotechnology. El marcador de peso molecular de una kilobase (*1 Kb Plus DNA Ladder*) fue suministrado por Invitrogen. La triptona fue suministrada por iNtRON Biotechnology. El extracto de levadura fue suministrado por Affymetrix. El agar fue suministrado por Cultimed. La T4 ADN ligasa y las bacterias *NEB® 5-alpha competent E. coli* fueron suministradas por New England Biolabs.

El tampón de Radioinmunoprecipitación *RIPA lysis buffer* fue suministrado por Santa Cruz Biotechnologies. El marcador de peso molecular *Precision Plus Protein® Dual Color* y las membranas de polifluoruro de vinilideno fueron suministradas por BioRad. Los anticuerpos anti *myc-tag* y IgG ligado a HRP y anti-conejo fueron suministrados por Cell Signaling Technology®. El kit *enhanced chemiluminescence Prime Western Blotting detection reagent* y la película fotográfica *X50 Hyperfilm® enhanced chemiluminescence* fueron suministrados por GE Healthcare. Los geles *Bolt™ 4-12 % Bis-Tris Plus*, el tampón de carga *Bolt™ LSD 4X* y el anticuerpo monoclonal gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, *GAPDH*, *HRP* fueron suministrados por Invitrogen. La agarosa, glicerol, ampicilina, *NaCl*, *GenElute™ Gel Extraction Kit*, *Carestream® Kodak® Autoradiography GBX Developer/Replenisher*, por Sigma Aldrich.

MÉTODOS

1 CULTIVO CELULAR

Todas las líneas celulares empleadas en el presente trabajo se cultivaron y mantuvieron en una atmósfera termostatzada de 37 °C y una presión relativa de CO₂ del 5 %. Su manipulación se llevó a cabo en cabinas de flujo laminar vertical, en condiciones totalmente estériles.

1.1 Descongelación celular

Para la descongelación celular se retiró el vial criogénico de su almacenamiento en nitrógeno líquido, y las células fueron resuspendidas el correspondiente medio de cultivo, centrifugadas durante 5 min a 1000 g y sembradas en una placa de 100 mm de diámetro.

1.2 Expansión celular

Una vez alcanzado el 80-90 % de confluencia, se llevó la expansión del cultivo celular, que consistió en el lavado de las células adherentes con PBS y posterior proteólisis de las uniones a la placa y entre células con tripsina. Transcurridos cinco min, se recogieron las células con medio de cultivo y se transfirieron a una (mantenimiento) o varias (expansión, según la necesidad) placas de 150 mm de diámetro.

1.3 Criopreservación celular

Para criopreservar células se partió de placas de 150 mm en las que la confluencia alcanzase al 80 %. Tras la tripsinización, las células se sedimentaron por centrifugación durante 8 min a 1000 g. Posteriormente, el sedimento se resuspendió en FBS suplementado con un 5 % de DMSO (CHO-K1 5-HT_{2A}) o un 10 % (resto de líneas celulares).

1.4 Siembra celular en placas multipocillo

La realización de ensayos farmacológicos requirió la siembra celular en placas de 96 o 384 pocillos. Las células se lavaron con PBS, se separaron con tripsina y sedimentaron. El sedimento se resuspendió en medio conteniendo FBS dializado por ultrafiltración, para evitar que la serotonina presente en el FBS interfiriese con los ensayos a realizar. Se determinó la concentración de células por mililitro en un contador electrónico automático VI-Cell™ XR (Beckman Coulter Life Sciences), y se sembró la densidad requerida por pocillo.

2 GENERACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS DEL RECEPTOR 5-HT_{2A} HUMANO Y DE LOS RECEPTORES MUTADOS

2.1 Mutagénesis dirigida

Para el estudio del efecto de la rotura del puente disulfuro formado entre la cisteína 148 y la 227 del receptor 5-HT_{2A}, se generaron tres construcciones a partir de pcDNA3-myc-5-HT_{2A}-eYFP, disponible en el laboratorio, con el kit comercial de mutagénesis dirigida *QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis kit* y siguiendo el protocolo comercial del fabricante. Las tres construcciones consistieron en la mutación de la C148^{3,25} en alanina; la mutación de la C227^{ECL-2} en alanina; y el doble mutante C148^{3,25}-C227^{ECL-2} en alaninas. Se eligió la alanina por ser un aminoácido no reactivo con una hidrofobicidad similar a las cisteínas.

Los cebadores empleados para introducir la mutación C148A fueron el cebador sentido 5'-GCCTCTGCCGAGCAAGCTTGCTGCAGTCGTGAT-3' y el cebador antisentido 5'-ATCCAGACTGCAGCAAGCTTGCTCGGCAGAGGC-3'. Los cebadores empleados para introducir la mutación C227A fueron el cebador sentido 5'-GGTCTTTAAGGAGGGGAGTGCCCTTACTCGCCGATGATAAC-3' y antisentido

5'-GTTATCATCGGCGAGTAAGGCACTCCCCTCCTTAAAGACC-3'. Todos los cebadores fueron purificados por electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se emplearon 15 ng de ADN por reacción, así como 125 ng de cada cebador, para preparar la mezcla de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuencia de PCR consistió en un ciclo de un minuto y medio a 95 °C de desnaturalización inicial del ADN, seguido de 18 ciclos de 1 min a 95 °C de desnaturalización, 50 s a 60 °C de hibridación de los cebadores y 10 min a 68 °C de elongación, con 10 min finales de elongación a 68 °C.

Las reacciones se mantuvieron en hielo durante 2 min, y se trataron durante 1 hora a 37 °C con la endonucleasa DpnI, que digiere ADN metilado y hemimetilado, esto es, ADN aislado en la mayor parte de bacterias comerciales, obteniendo como resultado únicamente ADN mutado.

Una vez transcurrido este tiempo, se procedió a transformar las bacterias competentes incluidas en el kit, *XL-10 Gold Ultracompetent Cells*. Estas bacterias se trataron 10 min con 2 µl de β-mercaptoetanol en hielo, seguido de la transformación de 45 µl de bacterias con 2 µl de resultado de la digestión. Después de 30 min en hielo, las bacterias se sometieron a un shock térmico de 42 °C durante 30 s, y se crecieron durante 1 hora en medio de crecimiento bacteriano de Luria Bertani LB (triptona bacteriológica al 1 %, extracto de levadura al 0,5 % y NaCl al 1 %). Transcurrido ese tiempo, las bacterias se sembraron en placas de LB conteniendo agar a una concentración de 6 g/l y ampicilina 100 µg/ml como antibiótico de selección, y se incubaron a 37 °C hasta observar colonias bacterianas.

De cada placa de crecimiento bacteriano, se eligieron 3 colonias que se hicieron crecer en medio LB conteniendo el antibiótico de selección, para la posterior extracción de ADN con el kit *GeneJet Plasmid Miniprep Kit*.

Las bacterias se sedimentaron a 5000 g durante 4 min, para homogeneizarlas en 250 µl de solución de resuspensión, y lisarlas en 250 µl de solución de lisis. Tras invertir el tubo de reacción, se neutralizó con 350 µl de solución de neutralización, se volvió a invertir el tubo varias veces y se centrifugó 5 min a 12000 g. El sobrenadante se transfirió a una columna *Thermo Scientific GeneJet Spin* y se centrifugó 1 minuto a 12000 g. Se lavó la columna dos veces con 500 µl de solución de lavado y se transfirió la columna a un microtubo de centrifuga. Se añadieron 50 µl de solución de elución y, tras dos min, se centrifugó a 12000 g. La concentración de ADN se determinó en un espectrofotómetro de micro volúmenes NanoDrop 2000 (Thermo Fisher). Se verificaron las secuencias de las construcciones mediante secuenciación (Secugen S.L., Madrid, España).

2.2 Purificación del ADN plasmídico

De las construcciones confirmadas se purificó su ADN mediante el kit *NucleoBond® Xtra Midi EF*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las bacterias se sedimentaron por centrifugación, a 5000 g durante 10 min a 4 °C, y se resuspendieron en 8 ml de tampón de resuspensión, tras lo cual se lisaron con un tratamiento de hidróxido y dodecilsulfato sódicos (*sodium dodecyl sulphate*, SDS) con 16 ml de tampón de lisis. Transcurridos 5 min, se neutralizó la reacción con 16 ml de tampón de neutralización, que facilita la precipitación del SDS, junto con proteínas y ADN genómico.

El kit permite la separación del ADN plasmídico del ADN genómico gracias a las columnas de intercambio aniónico *NucleoBond® Xtra*. Contienen una resina de silicio de intercambio aniónico con cargas positivas a pH ácido, que permite la unión específica de las cargas fosfato del ADN. Así, las columnas se equilibraron con tampón de equilibrado y se cargó toda la muestra, tras lo cual los filtros se lavaron tres veces con: 5 ml de tampón de filtrado, para eliminar residuos del lisado; 35 ml de tampón de lavado, y 15 ml de tampón para eliminar endotoxinas.

A continuación, se eluyó el ADN retenido en la columna con 5 ml de tampón de elución, que neutralizó la carga positiva de la resina, liberando así el ADN. Al eluido se le sumaron 3,5 ml de isopropanol y se centrifugó a 5525 g 1 hora a 4 °C. Una vez terminado, se lavó el pellet con 2 ml de etanol al 70 %, para volver a centrifugar a 5525 g 5 min. El líquido se decantó y el sedimento se reconstituyó en 300 µl de agua libre de endotoxinas. La concentración de ADN se determinó en un espectrofotómetro de micro volúmenes NanoDrop 2000 (Thermo Fisher).

2.3 Subclonaje a pcDNA5/FRT/TO

La generación de líneas estables mediante la tecnología FLP-In™ T-REx™ requiere de la presencia del inserto en un pcDNA5/FRT/TO. Por ello, las construcciones generadas en pcDNA3 se subclonaron a pcDNA5/FRT/TO, cedido por el Dr. Juan López Giménez (figura 18).

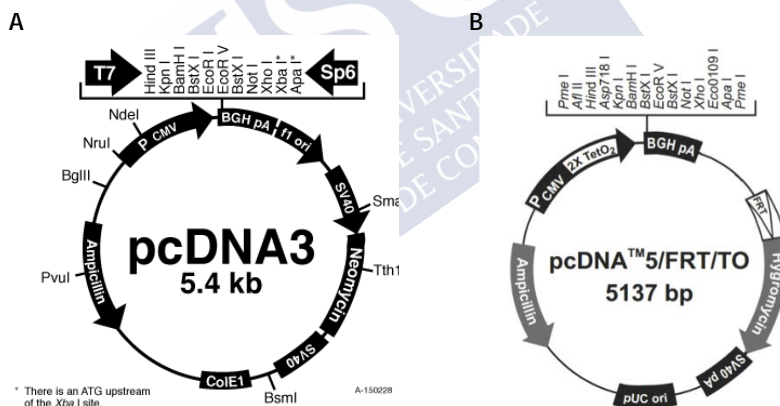


Figura 18. Mapa general del pcDNA3 (A) y del pcDNA5/FRT/TO (B). Imágenes adaptadas de Invitrogen.

Como enzimas de restricción, se eligieron BamHI y XhoI, presentes antes y después del inserto (*myc*-5-HT_{2A}-eYFP; *myc*-5-HT_{2A}C148A-eYFP; *myc*-5-HT_{2A}C227A-eYFP; *myc*-5-HT_{2A}C148A/C227A-eYFP), y en el sitio de clonaje múltiple del vector (pcDNA5/FRT/TO). Se digirieron 8 µg de cada

plásmido con 2 μ l de BamHI y 2 μ l de XhoI, junto con 4 μ l de *FastDigest Green Buffer* y agua destilada hasta completar la reacción de 20 μ l, durante 1 hora a 37 °C. Una vez transcurrido ese tiempo, se inactivaron las enzimas durante 5 min a 80 °C, y la muestra se corrió en un gel de agarosa al 1 % conteniendo 7,5 μ l de RedSafe™, durante 45 min a 90 V.

En la visualización del gel con luz ultravioleta se obtuvieron dos bandas: una banda de 2000 Kb, correspondiente al peso del receptor junto con *myc* y eYFP, y otra de alto peso molecular, correspondiente al resto del plásmido. Se seleccionaron las bandas de interés y se purificó el ADN obtenido con el *GelElute™ Gel Extraction Kit*, siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se añadió tres veces el peso de la banda del gel en volumen de solución de solubilización y se calentó a 50 °C durante 5 min. Se colocó una columna y tubo colector por condición. La columna se equilibró con 500 μ l de solución de preparación de columnas. Posteriormente, se añadió el equivalente en volumen del peso de la banda del gel de isopropanol, y se centrifugó a 16000 g un minuto, descartando el eluido. Se lavó con 700 μ l de solución de lavado, se centrifugó un minuto a 16000 g, y se transfirió la columna a un tubo colector vacío. Se añadieron 25 μ l de solución de elución y se dejó equilibrar la columna 5 min. Se centrifugó 4 min a 16000 g y se midió la concentración de ADN en el NanoDrop 2000 (Thermo-Fisher).

Para la ligación, se combinaron los fragmentos requeridos en una ratio 3:1 (vector: inserto), y se incubó 16 h a 16 °C junto con una T4 ligasa. Al día siguiente, la enzima se inactivo a 65 °C durante 10 min, y se transformaron 2 μ l del producto de ligación en bacterias competentes *NEB® 5-alpha competent E. coli*. En caso de crecimiento bacteriano, se crecieron tres colonias de cada tipo en medio LB suplementado con ampicilina, y su ADN se purificó con el kit *GeneJet Plasmid Miniprep Kit*. La concentración de ADN se determinó en un espectrofotómetro de micro volúmenes NanoDrop 2000 (Thermo Fisher). Las secuencias de las construcciones se

verificaron mediante secuenciación (Secugen S.L., Madrid, España).

3 GENERACIÓN DE LAS LÍNEAS ESTABLES

Una vez generadas las construcciones plasmídicas pcDNA5/FRT/TO-*myc*-5-HT_{2A}-eYFP (WT), pcDNA5/FRT/TO-*myc*-5-HT_{2A}C148A-eYFP (C148A), pcDNA5/FRT/TO-*myc*-5-HT_{2A}C227A-eYFP (C227A) y pcDNA5/FRT/TO-*myc*-5-HT_{2A}C148A/C227A-eYFP (C148A/C227A), se procedió a la generación de las líneas estables con la tecnología Flp-In™ T-REx™.

El sistema Flp-In™ T-REx™ permite la generación de líneas estables isogénicas que expresan de forma inducible el gen de interés de forma rápida y eficiente (157). Para ello, es necesario disponer de una línea huésped que tenga integrado un lugar FRT (figura 19), que permite la unión de la recombinasa Flp y facilita la integración del gen en el genoma de células de mamífero.

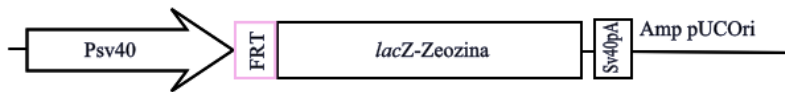


Figura 19. Esquema de introducción del lugar FRT en el genoma de las células. Imagen realizada por la autora

La línea huésped HEK293 que contiene este lugar FRT integrado es la línea Flp-In™ 293, y presenta resistencia al antibiótico de selección zeocina. Adicionalmente, si esta línea se transfecta con pcDNA6/TR, la línea celular se transforma en Flp-In™ T-REx™ 293, y expresa la proteína represora de tetraciclinas, TR, confiriendo además resistencia a blasticidina.

Esta última línea se transfecta con poG44, un plásmido que codifica la recombinasa Flp, junto con pequeñas cantidades del plásmido codificante del gen de interés, un GPCR, por ejemplo, clonado en un pcDNA5/FRT/TO. Éste se caracteriza por contener

dos operadores *tet2* entre la región promotora y la región codificante de la proteína, y un lugar FRT.

La recombinación consiste en que, al ser los dos lugares FRT (el de la línea huésped y el del plásmido) secuencias palindrómicas complementarias, con la ayuda de la recombinasa el gen se integra en el genoma según la **figura 20**, perdiendo la resistencia zeocina y adquiriendo resistencia a higromicina.



Figura 20. Esquema de introducción del gen de interés a través de la recombinación con la secuencia FRT introducida en el genoma. Imagen realizada por la autora.

Se genera así la línea celular Flp-In™ T-REx™ 293-*GPCR*, donde GPCR representa la proteína de interés que se quiera expresar en el sistema. El doble operador *tet2* presente antes de la región codificante impide que, en presencia de la proteína represora TR, el gen se transcriba (**figura 21**). Solo con la inactivación de TR tras la adición de una tetraciclina, como la doxiciclina, se produce la expresión del gen, lo que en este trabajo se denomina inducción.

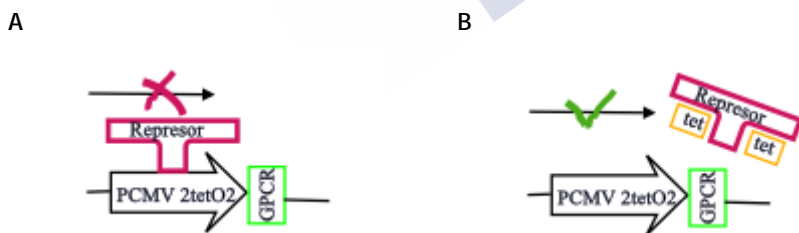


Figura 21. Inducción del gen de interés, un GPCR. En ausencia de tetraciclinas (A), el represor está unido al operador *tet2*, impidiendo la transcripción. La adición de tetraciclinas (B) permite la liberación del represor y la inducción del receptor.

De esta forma, el protocolo a seguir para la generación de líneas estables fue el que sigue. Se sembró la línea celular Flp-In™ T-REx™ 293 en cinco placas independientes, en medio completo y

a una densidad de $4 \cdot 10^6$ células por placa de 100 mm de diámetro. Al día siguiente, cada una de las placas se transfectó con uno de los plásmidos generados con PEI, en una ratio 4:1 (p/p). En consecuencia, 8 μg de ADN plasmídico (pOG44 + pcDNA5/FRT/TO-*GPCR*, en una ratio 9:1 p/p) se incubaron con 250 μl de Opti-MEM[®], medio reducido en suero, durante 20 min para permitir la formación de complejos. A la vez, se incluyó un control negativo, en el que no se añadió plásmido alguno. Las células se lavaron con PBS y se añadieron 7 ml de medio completo por placa. Posteriormente, la mezcla ADN-PEI se repartió lentamente sobre las células sembradas.

Transcurridas 24 h, se reemplazó el medio de cultivo por medio sin zeocina, debido a que la recombinación supone la pérdida de resistencia a zeocina, y tras otras 24 h, las células se pasaron a un matraz de cultivo celular de 75 cm^2 , de modo que la confluencia no superase el 25 %, con el objeto de facilitar la posterior selección de células positivas,

Una vez las células estuvieron adheridas al matraz de cultivo celular, el medio de cultivo se reemplazó por medio conteniendo 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de higromicina B.

El medio se reemplazó cada tres días, hasta que se observaron acúmulos celulares, que se sembraron en una placa de seis pocillos, para expandir según requerimiento.

Con el propósito de comprobar la correcta incorporación del gen en las células, se sembraron $5 \cdot 10^4$ células por pocillo de cada tipo celular en placas de 96 pocillos negras de fondo transparente, en dos condiciones: sin añadir doxíciclina (no inducidas), y añadiendo 10 ng/ml de doxíciclina (inducidas). 24 h más tarde, se comprobó la ausencia o presencia de fluorescencia generada por el fluoróforo eYFP ligado al *GPCR* (λ_{exc} 490-510 nm; λ_{em} 520-560 nm) en un microscopio de alto rendimiento Operetta[®] (Perkin Elmer), con un objetivo de 20 aumentos.

4 ENSAYOS FARMACOLÓGICOS DE UNIÓN DE RADIOLIGANDOS EN FRACCIÓN DE MEMBRANA

Los ensayos de unión de radioligandos son una herramienta eficaz en el descubrimiento temprano de fármacos, donde el estudio de las propiedades de la interacción fármaco-receptor resulta crucial, tanto para el cribado de fármacos como para el desarrollo de nuevas moléculas (158).

A pesar de los avances de la química biológica, los ligandos marcados con moléculas radiactivas como el tritio o el carbono 14, siguen empleándose tanto en la industria como el ámbito académico para el estudio de GPCRs, ya que proporcionan una medida directa de la interacción de la proteína con su ligando fisiológico o nuevas moléculas, y permiten cuantificar los niveles de expresión del receptor (159).

4.1 Preparación de homogeneizados de membrana

El sustrato más ampliamente utilizado para la realización de ensayos de unión de radioligandos a GPCRs es la fracción de membrana de un lisado celular que exprese el receptor de interés (160). Así, las células expresando el receptor 5-HT_{2A} se sembraron en placas de 150 mm, de forma que el día de recogida la confluencia alcanzase el 100 %.

24 h antes de la preparación, el medio de cultivo se substituyó por medio conteniendo FBS dializado. En el caso de las líneas Flp-In™ T-REx™, el medio se suplementó con 10 ng/ml de doxiciclina. Tras este tiempo, se aspiró el medio de cultivo y se lavaron las células dos veces con 10 ml de PBS. A continuación, se levantaron las células con ayuda de un rascador y se llevaron a un tubo de centrifuga, para ser sedimentadas a 800 g durante 15 min a 4 °C. Posteriormente, se resuspendió el pellet en 50 ml de tampón A (Tris-HCl 50 mM a pH 7,5). Para lisar las células, se homogeneizó la suspensión con un homogeneizador automático Polytron® (Kinematica), y se centrifugó a 48000 g durante 40 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó, y el sedimento, enriquecido en

proteínas de fracción de membrana celular, se resuspendió en tampón A para la determinación de la concentración de proteína, por el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad), utilizando BSA como estándar.

En el caso de muestras tratadas con DTT 20 mM, el pellet celular se resuspendió en 50 ml de PBS suplementado con DTT 20 mM, y se incubó a 37 °C durante 10 min en agitación suave. A continuación, las células se sedimentaron a 800 g durante 15 min a 4 °C. El pellet se resuspendió en 50 ml de PBS y se centrifugó en las mismas condiciones, con el objeto de retirar el DTT residual por completo. Posteriormente, las células se lisaron en tampón A y con ayuda del homogeneizador automático, según el protocolo descrito anteriormente.

4.2 Ensayos de linealidad de proteína.

Los ensayos de linealidad de proteína se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos, donde se incubaron 100 µl del homogeneizado de membrana a ensayar a distintas cantidades de proteína por pocillo (60 µg, 80 µg, 100 µg, 120 µg y 200 µg) con 25 µl de [³H]Ketanserina o [³H]LSD a una concentración de 1 nM. La reacción se completó hasta 250 µl con tampón A, y la unión no específica se determinó en presencia de metisergida 1 µM.

Transcurridos 30 min a 37 °C en agitación, el pipeteador automático Janus[®] (Perkin Elmer) transfirió 200 µl de la mezcla de reacción a una placa Multiscreen GF/B, pretratada con un 0,5 % de PEI, que se filtró y lavó seis veces con tampón Tris-HCl 50 mM a un pH 6,6. La placa se dejó secar al menos 2 h a 60 °C, tras lo cual se añadieron 30 µl por pocillo de Universol[™]. Por último, se leyó la radiactividad en un detector de centelleo líquido MicroBeta² 2450 (Perkin Elmer).

4.3 Ensayos de saturación de radioligandos

Los ensayos de saturación de radioligandos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos, donde se incubaron 100 µl del homogeneizado de membrana con 25 µl de [³H]Ketanserina o

[³H]LSD, utilizando ocho concentraciones distintas en el rango entre 0,6 nM y 10 nM. Para determinar la unión no específica se añadieron 25 µl de metisergida a una concentración de 1 µM, y la reacción se completó con tampón A hasta 250 µl. Transcurridos 30 min a 37 °C en agitación, el pipeteador automático Janus® (Perkin Elmer) transfirió 200 µl de la mezcla de reacción a una placa Multiscreen GF/B, pretratada con un 0,5 % de PEI, que se filtró y lavó seis veces con tampón Tris-HCl 50 mM a un pH 6,6. La placa se dejó secar al menos 2 h a 60 °C, tras lo cual se añadieron 30 µl por pocillo de Universol™. Por último, se leyó la radiactividad en un detector de centelleo líquido MicroBeta² 2450 (Perkin Elmer).

4.4 Ensayos cinéticos: asociación y disociación

Los ensayos cinéticos de unión de radioligandos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos, donde se incubaron 100 µl del homogeneizado de membrana CHO-K1 5-HT_{2A} (80 µg de proteína por punto) con 25 µl [³H]Ketanserina, a una concentración 1 de nM. La reacción se completó hasta 250 µl con tampón A, y la unión no específica se determinó en presencia de metisergida 1 µM.

Para los estudios de asociación del radioligando, se añadió el homogeneizado de membrana a distintos tiempos, entre 0 y 48 min, manteniendo una temperatura constante de 37 °C en agitación. Para el caso de los estudios de disociación del radioligando, se incubó la mezcla de reacción (homogeneizado de membrana, radioligando y, en su caso, metisergida) durante 30 min a 37 °C en agitación. Una vez se alcanzó el equilibrio, se adicionó metisergida 1 µM a distintos tiempos, entre 0 y 55 min, como agente disociador.

Finalizados los tiempos de incubación, se transfirieron 200 µl de la mezcla de reacción a una placa Multiscreen GF/B pretratada con PEI al 0,5 %, que se filtró y lavó seis veces con tampón Tris-HCl 50 mM a un pH 6,6. La placa se dejó secar al menos 2 h a 60 °C, tras lo cual se añadieron 30 µl por pocillo de Universol™,

para la posterior lectura de la radiactividad en un detector de centelleo líquido MicroBeta² 2450 (Perkin Elmer).

4.5 Ensayos de competición de radioligandos

Los ensayos de competición de unión de radioligandos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos, donde se incubaron 100 µl del homogeneizado de membrana CHO-K1 5-HT_{2A} (80 µg de proteína por punto) con 25 µl de [³H]Ketanserina, a una concentración de 1 nM, y 25 µl de cantidades crecientes (0,1 nM a 100 µM) de compuesto a ensayar: 5-HT, (±)DOI, LSD, clozapina y haloperidol. La reacción se completó hasta 250 µl con tampón A, y la unión no específica se valoró en presencia de metisergida 1 µM.

La mezcla de reacción se incubó durante 30 min a 37 °C en agitación, tras lo cual se transfirieron 200 µl a una placa Multiscreen GF/B pretratada con un 0,5 % de PEI, que se filtró y lavó seis veces con tampón Tris-HCl 50 mM a un pH 6,6. La placa se dejó secar durante 2 h a 60 °C, tras lo cual se añadieron 30 µl por pocillo de UniversolTM. Por último, se leyó la radiactividad en un detector de centelleo líquido MicroBeta² 2450 (Perkin Elmer).

5 ENSAYOS FARMACOLÓGICOS DE UNIÓN DE RADIOLIGANDOS EN CÉLULA ENTERA

Como complemento de los ensayos de unión de radioligando en membrana, se realizaron ensayos farmacológicos de unión en célula entera, que permiten la evaluación del comportamiento del ligando con un receptor en su microambiente celular, al permanecer la célula intacta (161).

5.1 Ensayos de linealidad de células

Para optimizar el número de células requerido para los ensayos de unión de radioligando, en célula entera, se sembraron en medio completo en placas de 96 pocillos transparentes, las células Flp-InTM T-RExTM 293-GPCR, pretratadas durante 30 min con poli-D-lisina a una concentración de 20 µg/ml. Las cantidades de células estudiadas fueron $2,5 \cdot 10^4$, $5 \cdot 10^4$, $7,5 \cdot 10^4$ y $10 \cdot 10^4$ células

por pocillo. El medio de siembra contenía doxiciclina a una concentración de 10 ng/ml.

24 h más tarde, se añadieron 20 μ l del radioligando [3 H]LSD a una concentración de 1 nM. En caso de estudios en los que el receptor 5-HT₇ debía ser bloqueado, se añadieron 20 μ l de SB269970 a una concentración final de 1 μ M. La unión no específica se determinó en presencia de metisergida 1 μ M. Todas las reacciones se completaron hasta 200 μ l con medio sin suplementar.

Las células se incubaron 30 min a 37 °C, sin agitación. Una vez transcurrido ese tiempo, la placa se lavó tres veces con 200 μ l por pocillo de NaCl al 0,9 % frío. Las células se lisaron con 100 μ l por pocillo de etanol absoluto, durante 20 min a 4 °C en agitación, y se trasvasaron 20 μ l del lisado a una placa *Flexiplate*, con ayuda del pipeteador automático Janus[®]. Se añadieron 100 μ l por pocillo de OptiPhase[®]. La placa se selló con una película selladora transparente y, tras una agitación de 20 min, se leyó la radiactividad en un detector de centelleo líquido MicroBeta² 2450 (Perkin Elmer).

5.2 Ensayos de competición de radioligandos

Una vez optimizado el número de células requerido para los ensayos de unión de radioligandos en célula entera, se sembraron 10000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos transparente, pretratada durante 30 min con poli-D-lisina a una concentración de 20 μ g/ml. El medio de siembra contenía, además, doxiciclina a una concentración de 10 ng/ml.

24 h más tarde, se añadieron 20 μ l del radioligando [3 H]LSD a una concentración de 1 nM, y 20 μ l de risperidona a distintas concentraciones en el rango 10 pM y 10 μ M. En caso de estudios en los que el bloqueo del receptor 5-HT₇ era necesario, se añadieron 20 μ l de SB269970 a una concentración final de 1 μ M. La unión no específica se determinó en presencia de metisergida

1 μ M. Todas las reacciones se completaron hasta 200 μ l con medio sin suplementar.

Las células se incubaron durante 30 min a 37 °C, sin agitación. Una vez transcurrido ese tiempo, la placa se lavó tres veces con 200 μ l/pocillo de NaCl al 0,9% frío. Las células se lisaron con 100 μ l/pocillo de etanol absoluto, durante 20 min a 4 °C, y 20 μ l del lisado se trasvasaron con ayuda del pipeteador automático Janus® a una placa *Flexipla*te, donde se añadieron 100 μ l por pocillo de OptiPhase®. La placa se selló con una película transparente y, tras una agitación de 20 min, se leyó la radiactividad en un detector de centelleo líquido MicroBeta² 2450 (Perkin Elmer).

6 MEDIDA DE ACUMULACIÓN DE IPS INTRACELULAR

La medida de la acumulación de especies de inositol fosfato (IPs) en el interior celular permite evaluar la respuesta del receptor 5-HT_{2A} mediada por G_q. La asimilación de inositol tritiado a estructuras celulares permite que, tras la estimulación del receptor y activación de la PLC, los fosfolípidos que hayan sido degradados a especies de inositol fosfato sean cuantificables gracias a su marcaje radiactivo.

Las medidas de acumulación de IPs se realizaron en placas de 96 pocillos transparentes. Se sembraron $2 \cdot 10^4$ células CHO 5-HT_{2A} o $7,5 \cdot 10^4$ células Flp-In T-REx-*GPCR*, en 100 μ l de medio conteniendo FBS dializado. En el caso de la línea Flp-InTM T-RExTM-*GPCR*, la placa se pretrató durante 30 min con 20 μ g/ml de poli-D-lisina.

Tras 24 h, se reemplazó el medio de crecimiento por medio conteniendo 10 μ Ci/ml de [³H]*myo*-inositol: DMEM/F-12 para las células CHO-K1 5-HT_{2A} o DMEM alto en glucosa suplementado con 10 ng/ml de doxiciclina para las células Flp-InTM T-RExTM 293-*GPCR*.

24 h más tarde, se lavaron las células durante 10 min con 100 μ l de tampón de ensayo (HBSS suplementado con HEPES 20 mM,

LiCl 20 mM y BSA al 2 %; pH 7,55) a 37 °C y 600 rpm. En el caso de requerir un tratamiento con DTT, el medio de ensayo se suplementó con DTT 20 mM.

Posteriormente, se añadieron los compuestos a estudiar en un rango de concentraciones entre 0,1 nM y 100 µM durante 20 min a 37 °C con agitación, tras lo cual las células se lisaron con 200 µl de ácido fórmico 100 mM durante 30 min a 4 °C. Se transfirieron 20 µl del lisado a una placa *Flexiplate*, y se homogeneizan con 80 µl de microesferas *RNA Binding YSi Spa Beads (Ribonucleic acid yttrium silicate scintillation proximity assay)* a una concentración de 62,5 ng/µl, durante una hora. La señal radiactiva se cuantificó en un Microbeta² 2450 (Perkin Elmer).

7 MEDIDAS DE MOVILIZACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR

El receptor 5-HT_{2A} moviliza calcio a través de la estimulación de la PLC por G_q. (105). De esta forma, la medida de la movilización de calcio intracelular tras la adición de un agente agonista permite evaluar la respuesta intracelular en presencia de un estímulo de este receptor.

La sonda Fura-2 es un indicador sensible a calcio que en ausencia de este ion se excita a 380 nm y emite a una longitud de onda de 510 nm, mientras que en presencia de calcio, la longitud de onda de excitación desciende a 340 nm (**figura 22**) (162). La representación de la razón de las señales resultado de la excitación a 340 nm y 380 nm permite la medida de movilización de calcio intracelular debido a la presencia de un estímulo.

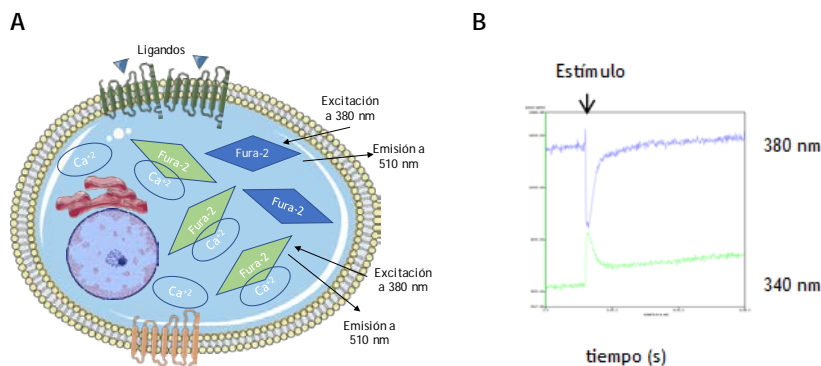


Figura 22. Esquema general de funcionamiento de la sonda Fura-2 QBT (A) y ejemplo de registro (B), en el que, en presencia de un estímulo, la señal obtenida tras la excitación de la sonda a 380 nm decae y la señal obtenida tras la excitación de la sonda a 340 nm aumenta. Imagen realizada por la autora.

Los ensayos de medida de acumulación de calcio se realizaron en placas de 384 pocillos negras de fondo transparente. Se sembraron $2 \cdot 10^4$ células CHO-K1 5-HT_{2A} o $6 \cdot 10^4$ células Flp-InTM T-RExTM-GPCR en medio completo, pretratadas con poli-D-lisina a una concentración de 20 μ g/ml. El medio de las células Flp-InTM T-RExTM-GPCR se suplementó con doxiciclina 10 ng/ml.

Transcurridas 24 h, se preparó la sonda resuspendiendo el contenido de un vial del kit Fura-2 QBTTM Calcium Kit en 10 ml de HBSS, suplementado con HEPES 20 mM y probenecid 5 mM, y ajustando el pH a 7,4. Una vez reconstituido, se añadieron 25 μ l de colorante por pocillo, y se incubó la placa 1 h a 37 °C.

Los cambios en la fluorescencia debidos a la movilización intracelular de calcio ($\lambda_{exc(1)}$ 340 nm, $\lambda_{exc(2)}$ 380 nm; λ_{em} 540 nm) se midieron usando un lector de placas de imagen fluorimétrica a tiempo real (FLIPR) FDSS7000EX, Hamamatsu®. Las lecturas se hicieron cada segundo. Se estableció una línea base de 120 s, y posteriormente se adicionaron:

- En el caso evaluar el efecto de ligandos agonistas, 25 μ l por pocillo de agonista a una concentración tres veces superior a la requerida en el ensayo. El pico de respuesta a agonistas ocurrió

entre 10 y 20 s pasada la adición, pero la medida de respuesta se prolongó hasta los 10 min.

- En el caso de evaluar el efecto de ligandos antagonistas, 12 μ l por pocillo de antagonista, a una concentración 6,25 veces superior a la requerida en el ensayo; lectura de 180 s y adición de 13 μ l por pocillo de agonista a una concentración 5,77 veces superior a la deseada en el ensayo. El pico de respuesta a agonistas ocurrió entre 10 y 20 s pasada la adición, pero la medida de respuesta se prolongó hasta los 10 min.

Para estudios del efecto de DTT en la señalización de calcio, tras la incubación de 1 hora con la sonda de calcio, se añadieron 10 μ l por pocillo de DTT a una concentración 180 mM. Tras 10 min a 37 °C, se procedió a la lectura correspondiente al ligando agonista y antagonista, según el protocolo descrito previamente.

En la expresión de resultados, se extrajeron las diferencias entre la señal máxima y la mínima, tras la excitación a 340 nm y tras la excitación a 380 nm, en los 10 min de registro. Se representó la razón entre la diferencia obtenida para 340 nm y la diferencia obtenida para 380 nM, expresándose como unidades de fluorescencia relativas (*relative fluorescence units*, RFU) en curvas dosis-respuesta.

8 ESTUDIOS DE TRÁFICO DEL RECEPTOR A LA MEMBRANA CELULAR

Con el objeto de estudiar el tráfico a la membrana de las tres construcciones mutadas, se sembraron $4 \cdot 10^4$ células por pocillo, de las líneas estables generadas Flp-In™ T-REx™ 293-GPCR, en medio completo y filtrado, en puntos por septuplicado. Se incluyeron dos condiciones: células con el receptor inducido, donde se añadió doxyciclina a una concentración de 10 ng/ml, y células no inducidas, donde el receptor no estaría expresado. Las placas de ensayo utilizadas fueron placas de 96 pocillos negras con el fondo transparente, pretratadas durante 30 min con 20 μ g/ml de poli-D-lisina.

24 h después de la siembra, se aspiró el medio y se añadieron 100 μ l de PFA al 4 % (m/v) en PBS como agente fijador (163) por pocillo. Transcurridos 10 min a temperatura ambiente, se aspiró el PFA, y se lavaron las células fijadas con 100 μ l de HBSS estéril. A continuación, se añadieron 50 μ l de ER-tracker™ 1 μ M, para teñir el retículo endoplasmático (RE). Se incubó la placa 30 min a temperatura ambiente, tras lo cual se añadieron 50 μ l de ER-tracker™ 1 μ M conteniendo Hoechst 33342 a una concentración de 2,5 μ g/ml, para teñir el núcleo, y se incubó otros 30 min a temperatura ambiente. Tras dos lavados con 100 μ l de HBSS, se tomaron imágenes de las células mediante un microscopio de alto contenido Operetta® (Perkin Elmer), con un objetivo de 60 aumentos y al menos seis campos por pocillo.

Se eligieron cuatro canales para la toma de fotografías (**figura 23**), que se comprobaron ser compatibles con la aplicación SpectraViewer®: Un campo claro *brightfield* para comprobar la morfología celular.

- Un canal de excitación a 500 nm y emisión a 540 nm para visualizar el receptor ligado a eYFP.

- Un canal de excitación a 350 nm y emisión a 445 nm para localizar los núcleos celulares.

- Un canal de excitación a 570 nm y emisión a 615 nm, para hacer visible el retículo endoplasmático.

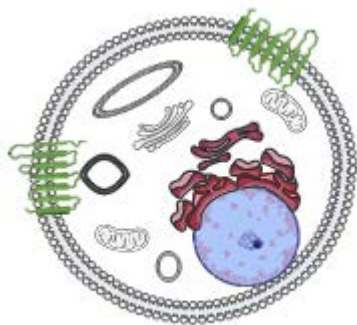


Figura 23. Esquema general de la célula tras la tinción: la coloración verde se corresponde al receptor; la coloración azul al núcleo, y la roja, al retículo endoplasmático. Imagen realizada por la autora.

Las imágenes se procesaron utilizando el programa informático de análisis de imagen Columbus® (Perkin Elmer), extrayéndose tres poblaciones de datos: intensidad total de eYFP en la célula, intensidad total de eYFP en membrana e intensidad de eYFP en retículo.

9 ANÁLISIS DE LA OLIGOMERIZACIÓN DEL RECEPTOR 5-HT_{2A} POR ESTUDIOS DE SATURACIÓN DE BRET

Los estudios de BRET constituyen una herramienta útil para el estudio de interacciones proteína-proteína en células vivas, como es el caso de la dimerización de GPCRs. Se basan en la transferencia de bioluminiscencia desde un donante de energía, una luciferasa, a un aceptor, una proteína fluorescente. Para el estudio de la interacción proteína-proteína, se cotransfectan dos plásmidos codificantes de la proteína de interés: uno ligado a la luciferasa y otro ligado a la proteína fluorescente. Si la distancia entre ambas proteínas es lo suficientemente pequeña, esto es, están interaccionando entre ellas, la adición de coelenterazina, una molécula emisora de luz, excitará a la luciferasa, que emite luz, y será la responsable de excitar la proteína fluorescente. La medida de la señal emitida por esta proteína permitirá determinar la

presencia de BRET y, por lo tanto, la interacción entre las dos proteínas (**figura 24**).

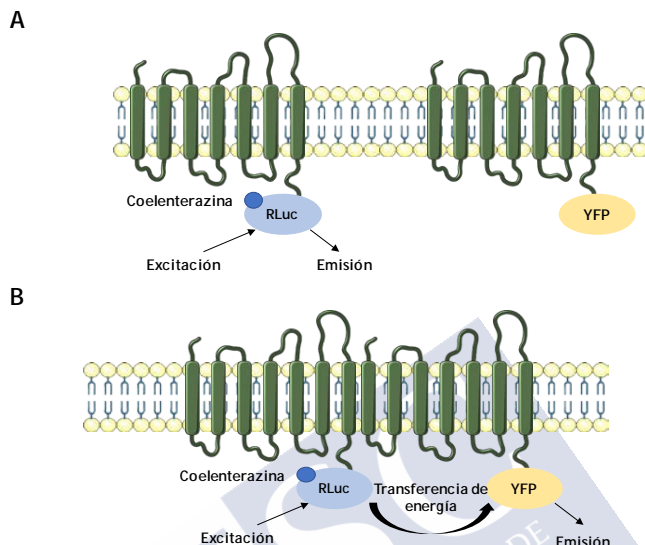


Figura 24. Esquema del fundamento de la tecnología BRET en el estudio de la dimerización de GPCRs, cuando una unidad está ligada a la molécula donante RLuc, y otra unidad ligada a la molécula aceptora YFP. (A) En el caso de dos GPCRs que no interaccionan entre ellos, la proximidad entre RLuc e YFP no es suficiente para que, al excitar RLuc se produzca una transferencia de energía. (B) En el caso de dos GPCRs que sí dimerizan, la excitación de RLuc conlleva una transferencia de energía donante-aceptor, e YFP emite luz. Imagen realizada por la autora.

Se emplearon las construcciones obtenidas de pcDNA3-GPCR, en donde el GPCR está ligado a eYFP, y a partir del plásmido pRLucN2 *myc*-5-HT_{2A}, cedido por la Dra. Marián Castro de la Universidad de Santiago de Compostela, se generaron las construcciones: pRLucN2 *myc*-5-HT_{2A} (RLuc-WT), pRLucN2 *myc*-5-HT_{2A}C148A (RLuc-C148A), pRLucN2 *myc*-5-HT_{2A}C227A (RLuc-C227A) y pRLucN2 *myc*-5-HT_{2A}C148A/C227A (RLuc-C148A/C227A).

Para cada condición se incubaron 1,25 ng de pRLucN2-GPCR junto con cantidades crecientes de plásmido pcDNA3-GPCR, hasta

alcanzar los 0,10 μg de pcDNA3-*GPCR*. La reacción se completó con un vector no codificante (pcDNA3) hasta 0,15 μg de ADN, en 150 μl de Opti-MEM®. Esta mezcla de ADN se incubó con 0,375 μl de Lipofectamina LTX (relación ADN/lipofectamina=0,4) y 0,15 μl de Plus Reagent, un potenciador de la transfección, durante 20 min.

La transfección se realizó en suspensión. Las células HEK293T/17 se centrifugaron a 1000 g durante 8 min, y se sembraron a una densidad de $5 \cdot 10^4$ células por pocillo en medio conteniendo FBS dializado, en una placa de 96 pocillos blanca. Se añadieron 50 μl por pocillo de los complejos ADN-lipofectamina formados, y se incubó la placa a 37 °C al 5 % de CO_2 .

24 h más tarde, las células se lavaron con PBS suplementado con CaCl_2 0,9 mM y MgCl_2 0,5 mM (tampón de ensayo). Se añadieron 40 μl de tampón de ensayo por pocillo, y se realizó una lectura de fluorescencia total ($\lambda_{\text{exc}}=480$ nm; $\lambda_{\text{em}} 530$ nm) en el lector de placas multipocillo Infinite® M1000 (Tecan). Posteriormente, se añadieron 10 μl por pocillo de coelenterazina a una concentración 125 μM (concentración final en el ensayo de 25 μM), y se incubó la placa 10 min a 37 °C.

Las lecturas de medida de transferencia de energía se realizaron en el lector de placas multipocillo Infinite® M1000 (Tecan), y 10 min más tarde, se realizó una lectura final de bioluminiscencia total.

10 ANÁLISIS DE LA HOMODIMERIZACIÓN DEL RECEPTOR 5-HT_{2A} POR WESTERN BLOT

10.1 Preparación de la muestra

Se crecieron las células Flp-In™ T-REx™ 293-*GPCR* hasta alcanzar el 80 % de confluencia, y se les cambió el medio por medio conteniendo 10 ng/ml de doxiciclina. Tras 24 h, las células se lavaron con PBS, se recogieron y se centrifugaron a 1000 g durante 5 min. El centrifugado se resuspendió en 1 ml de tampón

de ensayo de RIPA suplementado con ortovanadato sódico al 1 % (v/v), una solución de inhibidores de proteasas al 1 % (v/v) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo al 1 % (v/v), y se homogeneizó por rotación durante 1 hora a 4 °C. La suspensión se centrifugó a 14000 g durante 30 min a 4 °C, se recogió el sobrenadante y se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Bradford.

10.2 Western Blot

Se incubaron alícuotas de 60 µg de proteína durante 20 min a 37 °C, en tampón de carga Bolt™ dodecilsulfafo de litio 4X y posteriormente se cargaron en un gel de poliacrilamida Bolt™ 4-12 % Bis-Tris Plus. La electroforesis se llevó a cabo durante 2 h a 110 V, en tampón ácido 4-morfolinetano sulfónico-dodecilsulfato sódico.

Para el Western Blot, las membranas de polifluoruro de vinilideno se activaron un minuto en metanol, y se sumergieron en tampón de transferencia Towbin modificado (metanol 20 % (v/v), Tris 20 mM, glicina 150 mM a pH 8,3), durante al menos 10 min. Posteriormente, la transferencia semiseca duró 90 min a 15 V.

Una vez terminada, se lavaron las membranas con tampón Tris-salino suplementado con *Tween 20* al 0,1 % (v/v) (TBS-T), y se bloquearon con BSA al 5 % durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Tras el lavado de las membranas con TBS-T, se añadió una dilución 1:1000 de anticuerpo primario de conejo anti-*myc* y una dilución 1:10000 de anticuerpo anti-GAPDH ligado a peroxidasa de rábano, HRP.

Tras 16 h a 4 °C, se lavaron las membranas con TBS-T, y se hibridó un anticuerpo anti-conejo ligado a HRP a una concentración 1:5000, durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Tras el lavado con TBS-T, se procedió al revelado de las membranas, con el kit *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* según las especificaciones del fabricante.

11 ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE DATOS

En la presente tesis doctoral, los resultados obtenidos se expresaron como la media \pm error estándar de la media (EEM). Para la realización del análisis y procesamiento de datos se utilizó el programa informático GraphPad Prism[®] versión 5.00. La comparación estadística entre dos curvas se realizó mediante la prueba F de suma extra de cuadrados. La comparación estadística entre grupos se realizó con un test *t* de Student. La significación estadística se estableció a $\alpha = 0,05$.

11.1 Ensayos de unión de ligandos

Para los ensayos de unión, se definió la unión específica del radioligando (*Specific Binding*, SB) como la diferencia entre su unión total (*Binding Total*, BT) y su unión no específica (*Non-Specific Binding*, NSB).

En los ensayos de saturación, la ecuación que define la unión específica del radioligando al receptor describe una hipérbola rectangular:

$$Y = \frac{B_{\max} \cdot X}{K_D + X}$$

donde *X* es la concentración de radioligando libre, B_{\max} es la máxima densidad de sitios de unión y K_D es la constante de disociación del radioligando por el receptor. La B_{\max} se expresó en fmol/mg de proteína. Para su cálculo, el SB en cuentas por minuto (cpm) se multiplicó por un factor corrector dependiente de la eficiencia del lector de radiactividad (1,4 en este caso) para obtener las desintegraciones por minuto (dpm). Estas se convirtieron a femtomoles utilizando la actividad específica de cada radioligando y la cantidad de proteína por punto empleada.

En los ensayos de asociación, se empleó una ecuación de una fase:

$$\% SB = Y_{\max} \cdot (1 - e^{-k_{obs} \cdot X})$$

donde X es la concentración de radioligando libre, % SB es el porcentaje de unión específica, Y_{\max} la máxima asociación específica del radioligando al receptor, y k_{obs} la constante de asociación observada en el ensayo, y representa tanto la asociación como la disociación del complejo ligando-receptor. Para el cálculo de la constante de asociación se empleó la ecuación:

$$k_{\text{on}} = \frac{k_{\text{obs}} - k_{\text{off}}}{[\text{radioligando}] \text{ (nM)}}$$

Para el cálculo de la k_{off} se realizaron ensayos cinéticos de disociación, donde se empleó una ecuación de decaimiento de una fase, según la ecuación:

$$\% \text{ SB} = (Y_0 - \text{Plateau}) \cdot e^{-k_{\text{off}} \cdot X} + \text{plateau}$$

donde X es la concentración radioligando libre, % SB es el porcentaje de unión específica, Y_0 representa el radioligando unido antes de comenzar la disociación y el *plateau* representa la asíntota de la disociación. Y para el cálculo del tiempo de vida media, $t_{1/2}$ se calculó como:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_{\text{off}}}$$

En los ensayos de competición, la ecuación que define la competición establecida entre radioligando y compuesto competidor por la ocupación de un único sitio de unión describe una curva sigmoidea:

$$Y = \text{NSB} + \frac{\text{BT} - \text{NSB}}{1 + 10^{X - \log \text{IC}_{50}}}$$

donde Y es la unión medida en presencia de diferentes concentraciones de ligando competidor, BT es la unión total, NSB es la unión no específica, X es la concentración de este ligando y la IC_{50} , la concentración de ligando competidor necesaria para inhibir el 50 % de unión específica del radioligando al receptor.

A partir de los ensayos de competición, la ecuación empleada para el cálculo de la constante de afinidad K_i fue la siguiente:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{X}{K_D}}$$

donde IC_{50} representa la concentración de ligando competidor necesaria para inhibir el 50 % de la unión específica del radioligando al receptor, X la concentración de radioligando empleada y K_D la constante de disociación en el equilibrio del radioligando, obtenida en ensayos de saturación.

En caso de compuestos que compiten por dos sitios de unión al receptor, el ajuste viene dado por la siguiente ecuación:

$$Y = NSB + SB \cdot \left[\frac{\text{fracción 1}}{1 + 10^{x - \log IC_{50}^2}} + \frac{1 - \text{fracción 1}}{1 + 10^{x - \log IC_{50}^1}} \right]$$

donde *fracción 1* representa la fracción de receptores con una $IC_{50(1)}$ y *fracción 2* representa la fracción de receptores con una $IC_{50(2)}$.

11.2 Ensayos funcionales

La ecuación empleada para representar la función fue una ecuación dosis-respuesta sigmoidea, que representa la respuesta como función del logaritmo de la concentración, de forma que:

$$E = E_{basal} + \frac{E_{max} - E_{basal}}{1 + 10^{\log EC_{50} - X}}$$

donde E es la respuesta obtenida a una concentración de compuesto X , E_{basal} la respuesta obtenida en ausencia de estímulo, E_{max} la máxima respuesta o eficacia y EC_{50} la potencia del agonista, la concentración a la que se obtiene la mitad de la respuesta máxima. En el caso de estudio de comportamientos antagonistas, la constante obtenida será la IC_{50} o potencia del antagonista.

Para el cálculo de la constante de disociación del complejo antagonista-receptor o potencia del antagonista, se empleó la ecuación:

$$K_B = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{C}{EC_{50}}}$$

donde K_B es la constante de disociación del antagonista, IC_{50} la potencia del antagonista resultado del ensayo funcional, C la concentración de agonista empleado en el ensayo y EC_{50} la potencia del agonista.

11.3 Ensayos de saturación de BRET

Los valores de BRET se expresaron en función de la emisión de eYFP y la emisión de RLuc. Para ello, se realizaron tres lecturas: una lectura inicial de fluorescencia, de la que se obtienen los valores de emisión eYFP; una lectura tras la adición de coelenterazina, de la que se extraen los valores de BRET; y una lectura posterior de luminiscencia, para obtener los valores de emisión RLuc.

Así, en el eje de abscisas se representó la razón de emisiones de la primera y tercera lectura, según la ecuación:

$$X = \frac{YFP_c}{RLuc_q} \cdot 1000$$

donde YFP_c representa los valores de emisión de eYFP obtenidos por punto menos la media del valor de emisión de eYFP obtenido en células transfectadas solo con RLuc; y $RLuc_q$ representa los valores de emisión de RLuc obtenidos por punto.

En el eje de ordenadas se representó el Ratio BRET en unidades mili net BRET de la segunda lectura, siguiendo la ecuación:

$$Y = \frac{\text{emisión } 530 \text{ nm}}{\text{emisión } 480 \text{ nm}} - c_f$$

donde emisión a 530 nm representa la emisión de eYFP tras la excitación por RLuc; emisión a 480 nm representa la emisión de RLuc tras la adición de coelenterazina; y c_f la emisión 530 nm/emisión 480 nm de los pocillos transfectados únicamente con RLuc. Una vez obtenidos los valores del Ratio net BRET, se multiplicaron por 1000 (unidades mili net BRET).

Los datos se ajustaron a una curva hiperbólica según la ecuación:

$$Y = \frac{BRET_{max} \cdot X}{BRET_{50} + X}$$

donde $BRET_{max}$ representa la máxima señal de BRET obtenida; X, la razón de emisiones $(YPF_c/RLuc_q) \cdot 1000$ y $BRET_{50}$ la razón de emisiones a la que se obtiene un 50 % del $BRET_{max}$.



RESULTADOS



1 LA PÉRDIDA DE PUENTES DISULFURO EXTRACELULARES CONDICIONA LA FARMACOLOGÍA DEL RECEPTOR 5-HT_{2A} HUMANO

Con el objeto de estudiar la relevancia de la reducción de puentes disulfuro extracelulares del receptor 5-HT_{2A} en la unión y función de ligandos, se empleó el agente reductor DTT.

El tratamiento consistió en la incubación de las células CHO-K1 5-HT_{2A} con DTT 20 mM durante 10 min a 37 °C. La valoración de la unión de ligandos se realizó en la fracción de membrana de dichas células, empleando [³H]Ketanserina como radioligando. El estudio del efecto del DTT en la señalización intracelular se realizó con medidas de acumulación de IPs y movilización de calcio.

1.1 El tratamiento con DTT 20 mM de células que expresan el receptor 5-HT_{2A} disminuyó la unión específica de [³H]Ketanserina

Para evaluar la influencia del tratamiento con DTT 20 mM en la unión de [³H]Ketanserina al receptor 5-HT_{2A}, se llevaron a cabo estudios de saturación sobre membranas expuestas y no expuestas a DTT (**figura 25**). La constante de disociación en el equilibrio de [³H]Ketanserina se mantuvo inalterada en presencia de DTT, al compararlo con membranas no expuestas ($p=0,79$; test t de Student), si bien la unión específica se redujo en un 25 % (**tabla 2**).

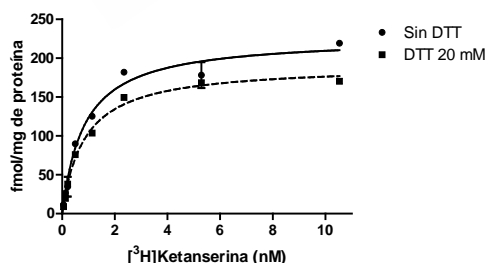


Figura 25. Curvas de saturación del radioligando [³H]Ketanserina, en membranas de células CHO-K1 5-HT_{2A} sin tratar (trazo continuo) y tratadas con DTT 20 mM (trazo discontinuo). Los puntos representan la media \pm EEM de un experimento representativo de dos experimentos independientes, realizados por triplicado.

Tabla 2. Unión máxima (B_{\max}) y constante de disociación en el equilibrio (K_D) del radioligando [^3H]Ketanserina en membranas CHO-K1 5-HT_{2A} sin tratar y tratadas con DTT 20 mM durante 10 min a 37 °C. Los datos representan la media \pm EEM de dos experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$ (test t de Student).

	B_{\max} (fmol/mg de proteína)	K_D (nM)
Sin DTT	242,20 \pm 11,15	0,77 \pm 0,20
DTT 20 mM	181,30 \pm 8,65*	0,69 \pm 0,13

1.2 El tratamiento con DTT 20 mM de células que expresan el receptor 5-HT_{2A} no modificó la cinética de unión de [^3H]Ketanserina

Se estudió el efecto del DTT 20 mM en la cinética de asociación (**figura 26A**) y disociación (**figura 26B**) de [^3H]Ketanserina, en membranas de células CHO-K1 que expresan de forma estable el receptor 5-HT_{2A}. Además del descenso de un 8 % en el porcentaje de unión específico de [^3H]Ketanserina, en concordancia con el descenso observado en el equilibrio, no se observó una alteración de las constantes cinéticas k_{on} y k_{off} (**tabla 3**). Como resultado, la constante de disociación en el equilibrio calculada como la razón $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ fue 0,45 nM en el caso de las células no expuestas DTT, similar al de células expuestas a DTT, que fue 0,47 nM.

Con respecto al tiempo de residencia de [^3H]Ketanserina, se observó una tendencia al aumento: 1,5 veces en el caso del tiempo de residencia de asociación y 1,2 veces en el caso del tiempo de residencia de disociación, si bien este aumento no resultó ser estadísticamente significativo ($p=0,33$ y $p=0,48$, respectivamente; test t de Student).

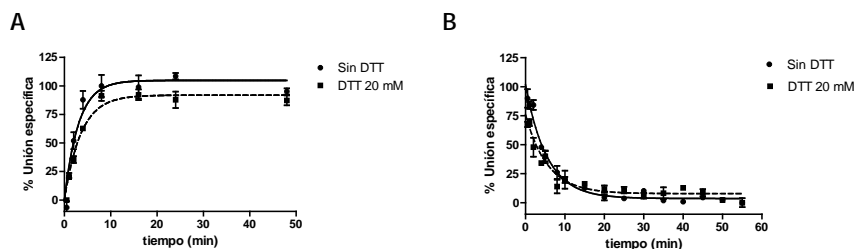


Figura 26. Curvas de asociación (A) y disociación (B) del radioligando [^3H]Ketanserina, en membranas de células CHO-K1 5-HT_{2A} sin tratar (trazo continuo) y tratadas con DTT 20 mM (trazo discontinuo). Se consideró como el 100 % la unión específica obtenida tras 30 min de incubación con [^3H]Ketanserina en membranas no expuestas a DTT. Los puntos representan la media \pm EEM de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

Tabla 3. Parámetros cinéticos del radioligando [^3H]Ketanserina en membranas de células CHO-K1 5-HT_{2A} sin tratar y tratadas con DTT 20 mM durante 10 min a 37 °C. Se consideró la unión específica obtenida tras 30 min de incubación con [^3H]Ketanserina en membranas sin DTT como el 100 %. Los datos representan la media \pm EEM de dos experimentos independientes realizados por duplicado. * $p < 0,01$ (test t de Student).

	% Unión específica	k_{on} ($\text{nM}^{-1}\text{min}^{-1}$)	$t_{1/2}$ asociación (min)	k_{off} (min^{-1})	$t_{1/2}$ disociación (min)
Sin DTT	96 \pm 0,36	0,44	0,93 \pm 0,20	0,20 \pm 0,03	3,56 \pm 0,41
DTT 20 mM	87,77 \pm 1,82*	0,36	1,38 \pm 0,21	0,17 \pm 0,04	4,33 \pm 0,80

1.3 En presencia de DTT 20 mM la curva de competición de (\pm)DOI frente a [^3H]Ketanserina pasó a ser monofásica

Se estudió el efecto del tratamiento con DTT 20 mM en la unión de ligandos agonistas (**figura 27**) y antagonistas (**figura 28**) en membranas de células CHO-K1 5-HT_{2A}. Se observó que la unión específica de [^3H]Ketanserina se redujo de manera estadísticamente significativa en membranas expuestas a DTT independientemente del ligando utilizado.

La 5-HT y el LSD mostraron curvas de competición monofásicas frente a la [^3H]Ketanserina, sin que el tratamiento con DTT alterase la

afinidad por el receptor (**tabla 4**). Sin embargo, la curva concentración-respuesta obtenida del desplazamiento de [3 H]Ketanserina por (\pm)DOI se ajustó a una curva de dos fases, a diferencia de la curva monofásica obtenida en membranas expuestas a DTT, cuya afinidad coincidió con la afinidad baja de la curva bifásica obtenida en membranas de células no expuestas a DTT (**tabla 4**).

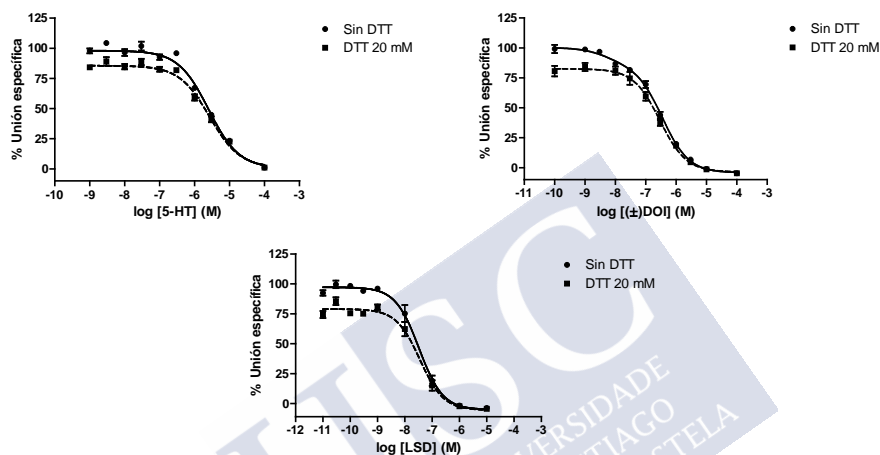


Figura 27. Curvas de competición de los agonistas 5-HT, (\pm)DOI y LSD con el radioligando [3 H]Ketanserina, en membranas de células CHO-K1 5-HT_{2A} sin tratar (trazo continuo) y tratadas con DTT 20 mM (trazo discontinuo). Se consideró la unión específica de [3 H]Ketanserina en ausencia de competidor como el 100 % de unión específica. Los puntos representan la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado.

Tabla 4. Unión específica y afinidad (K_i) de 5-HT, (\pm)DOI y LSD en membranas de células CHO-K1 5-HT_{2A} sin tratar y tratadas con DTT 20 mM durante 10 min a 37 °C. Se consideró la unión específica de [³H]Ketanserina en ausencia de competidor como el 100 % de unión específica. Los puntos representan la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (test t de Student).

	% Unión específica		K_i (nM)	
	Sin DTT	DTT 20 mM	Sin DTT	DTT 20 mM
5-HT	96,78 \pm 1,38	85,21 \pm 2,10*	980,00 \pm 87,00	1105 \pm 111
(\pm)DOI	98,66 \pm 2,19	78,16 \pm 1,77**	Alta 4,56 \pm 1,56 Baja 125 \pm 14,22	148,41 \pm 41,00
LSD	98,87 \pm 0,71	80,44 \pm 1,64***	13,54 \pm 3,96	12,93 \pm 4,41

En el caso de los ligandos antagonistas clozapina, haloperidol, ketanserina y metisergida, la afinidad permaneció inalterada en presencia de tratamiento con DTT 20 mM. La unión específica de [³H]Ketanserina se redujo con respecto a la obtenida en células no expuestas a DTT (**tabla 5**).

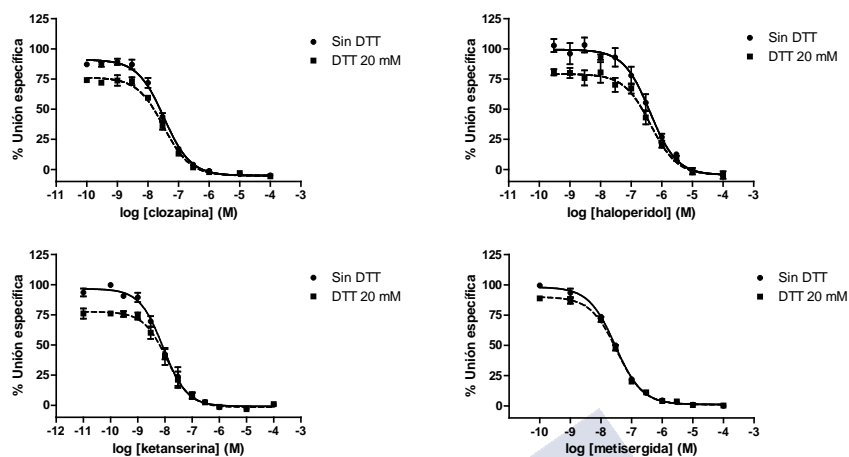


Figura 28. Curvas de competición de los agonistas 5-HT, (\pm)DOI y LSD con el radioligando [3 H]Ketanserin, en membranas de células CHO-K1 5-HT_{2A} sin tratar (trazo continuo) y tratadas con DTT 20 mM (trazo discontinuo). Se consideró la unión específica de [3 H]Ketanserin en ausencia de competidor como el 100 % de unión específica. Los puntos representan la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado.

Tabla 5. Unión específica y afinidad (K_i) de clozapina, haloperidol, ketanserin y metisergida en membranas de células CHO-K1 5-HT_{2A} sin tratar y tratadas con DTT 20 mM durante 10 min a 37 °C. Se consideró la unión específica de [3 H]Ketanserin en ausencia de competidor como el 100 % de unión específica. Los puntos representan la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (test t de Student).

	% Unión específica		K_i (nM)	
	Sin DTT	DTT 20 mM	Sin DTT	DTT 20 mM
Clozapina	98,98 \pm 1,92	77,30 \pm 2,91*	14,05 \pm 2,23	13,85 \pm 2,69
Haloperidol	98,42 \pm 4,42	77,55 \pm 0,07*	157 \pm 50,5	167 \pm 9,00
Ketanserin	96,56 \pm 1,92	77,95 \pm 2,13**	4,44 \pm 1,69	2,22 \pm 0,4
Metisergida	98,78 \pm 4,36	83,42 \pm 4,22	10,43 \pm 0,69	7,59 \pm 3,31

1.4 El tratamiento con DTT 20 mM de células que expresan el receptor 5-HT_{2A} humano disminuyó la eficacia de los agonistas

La evaluación del efecto del DTT 20 mM en la señalización del receptor 5-HT_{2A} mediada por PLC se realizó a dos niveles: midiendo la acumulación de IPs y midiendo la movilización de calcio.

1.4.1 El tratamiento del receptor 5-HT_{2A} con DTT 20 mM alteró la transducción de señales al valorar la acumulación de IPs.

Se ensayaron concentraciones crecientes de los agonistas 5-HT, (±)DOI y LSD, para evaluar su capacidad de producir una acumulación de IPs, en células no expuestas y expuestas a DTT 20 mM (**figura 29**). El tratamiento con DTT disminuyó de manera estadísticamente significativa la eficacia de 5-HT, (±)DOI y LSD, sin alterar las potencias de dichos ligandos (**tabla 5**).

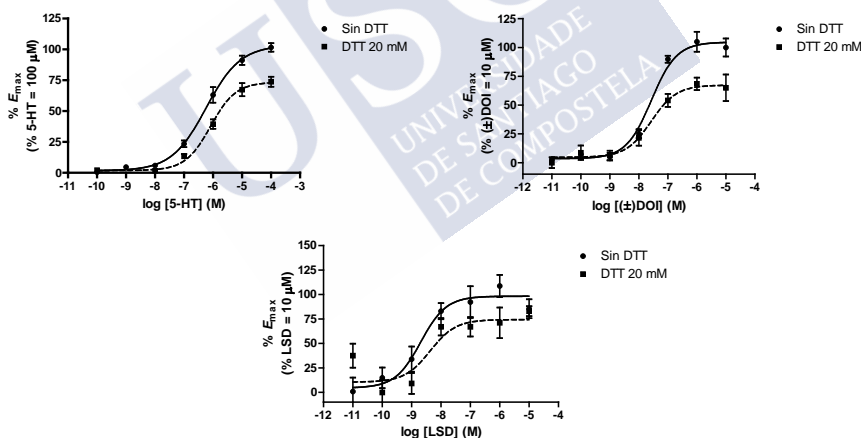


Figura 29. Curvas concentración-respuesta de acumulación de IPs de los agonistas 5-HT, (±)DOI y LSD, en células CHO-K1 5-HT_{2A}, sin tratar (trazo continuo) y tratadas con DTT 20 mM (trazo discontinuo). Se consideró el 100 % la respuesta máxima de cada agonista sin DTT. Los puntos representan la media ± EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Tabla 5. Potencia (EC_{50}) y porcentaje de reducción de respuesta máxima a agonista en acumulación de IPs de 5-HT, (\pm)DOI y LSD en células CHO-K1 5-HT_{2A} sin tratar y tratadas con DTT 20 mM durante 10 min a 37 °C. Se consideró el 100 % la respuesta máxima de cada agonista sin DTT. Los puntos representan la media \pm EEM de al menos dos experimentos realizados por triplicado.

	EC_{50} (nM)		% Reducción de respuesta máxima a agonista
	Sin DTT	DTT 20 mM	DTT 20 mM
5-HT	359,50 \pm 35,50	564,00 \pm 30,50	27,29 \pm 1,62
(\pm)DOI	27,23 \pm 2,43	31,20 \pm 5,90	39,00 \pm 12,00
LSD	2,90 \pm 1,77	3,95 \pm 0,70	31,38 \pm 5,90

Con respecto a los ligandos antagonistas, se evaluaron cantidades crecientes de clozapina y haloperidol en presencia de 5-HT 1 μ M, de (\pm)DOI 0,1 μ M y de LSD 0,1 μ M (**figura 30**). Se observó un descenso de al menos un 20 % en la respuesta máxima inducida por los agonistas. Sin embargo, la potencia de los antagonistas permaneció inalterada (**tabla 6**).

La curva concentración-respuesta de acumulación de IPs de clozapina en presencia de 5-HT en células no tratadas y tratadas con DTT 20 mM se publicó en Iglesias *et al.*, 2017. La K_B de la clozapina resultó ser 12,6 nM, similar a la obtenida en presencia de DTT, 36,1 nM. El porcentaje de reducción de la respuesta máxima fue de 58,2 %.

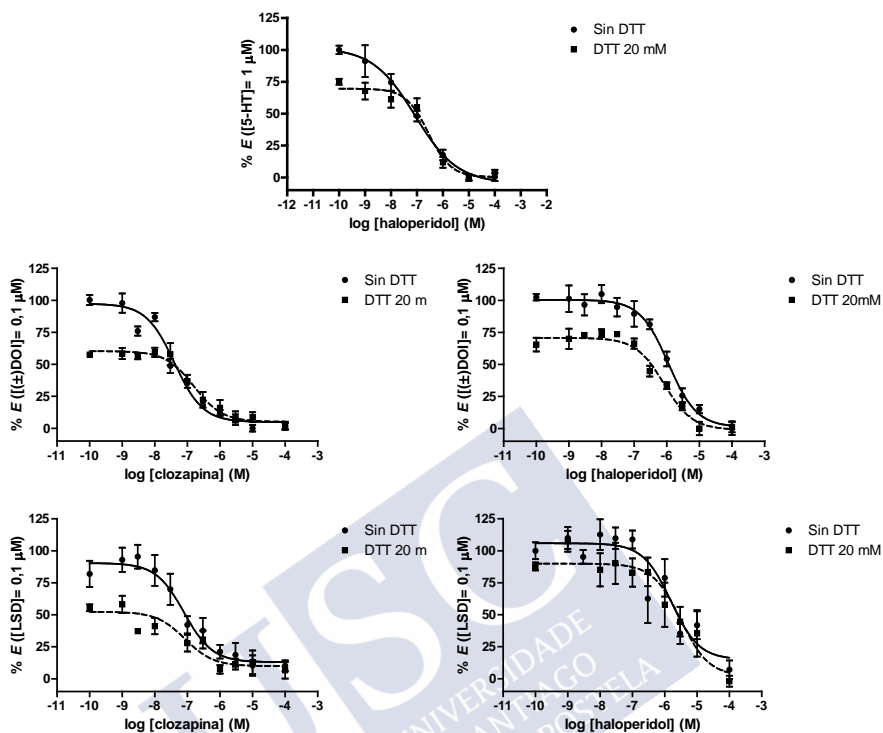


Figura 30. Curvas concentración-respuesta de acumulación de IP₃ de los antagonistas clozapina y haloperidol en presencia de 5-HT 1 μ M, (\pm)DOI 0,1 μ M y LSD 0,1 μ M, en células CHO-K1 5-HT_{2A}, sin tratar (trazo continuo) y tratadas con DTT (trazo discontinuo). Se consideró la estimulación en ausencia de antagonista como el 100 %. Los puntos representan la media \pm EEM de al menos dos experimentos independientes realizados por triplicado.

Tabla 6. Potencia de clozapina y haloperidol (K_B) y porcentaje de reducción de respuesta máxima a agonista en acumulación de IPs en células CHO-K1 5-HT_{2A} no tratadas y tratadas con DTT 20 mM durante 10 min a 37 °C. Los datos representan la media \pm EEM de al menos dos experimentos independientes realizados por triplicado.

Antagonista	Agonista	K_B (nM)		% Reducción de respuesta máxima a agonista
		Sin DTT	DTT 20 mM	DTT 20 mM
Haloperidol	5-HT 1 μ M	27,30 \pm 2,80	65,15 \pm 10,45	19,76 \pm 8,77
Clozapina	(±)DOI 0,1 μ M	14,97 \pm 4,14	49,55 \pm 33,95	37,58 \pm 2,72
Haloperidol		242,50 \pm 0,50	232,00 \pm 2,00	30,44 \pm 7,25
Clozapina	LSD 0,1 μ M	2,59 \pm 1,37	12,41 \pm 5,86	44,60 \pm 6,02
Haloperidol		34,61 \pm 12,14	91,00 \pm 6,70	21,34 \pm 3,17

1.4.2 Optimización de las medidas de movilización de calcio intracelular en células CHO-K1 5-HT_{2A}

Se desarrolló un método de medida de calcio intracelular mediante la sonda Fura-2, optimizando las condiciones en células CHO-K1 expresando de forma estable el receptor 5-HT_{2A}.

Para optimizar el marcaje con la sonda fluorescente, se construyeron curvas concentración-respuesta de 5-HT en tres condiciones:

- Células en ausencia de FBS, y suplementando el medio de ensayo con probenecid 2,5 mM (**figura 31A**).
- Células en presencia de FBS dializado (**figura 31B**).
- Células en presencia de FBS dializado y suplementando el medio de ensayo con probenecid 2,5 mM (**figura 31C**).

Para cuantificar la movilización de calcio intracelular en células CHO-K1 5-HT_{2A} se requieren FBS y probenecid. En estas condiciones, la potencia de la 5-HT fue de 16,54 nM, similar a la descrita en la bibliografía (164).

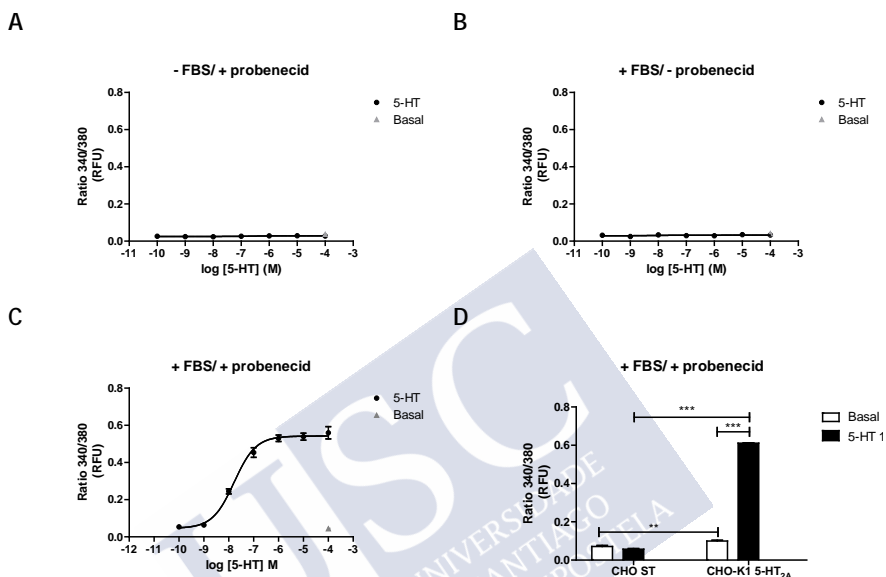


Figura 31. Movilización de calcio en células CHO-K1 5-HT_{2A} tras la adición de cantidades crecientes de 5-HT en ausencia de FBS y presencia de probenecid (A); en presencia de FBS dializado y ausencia de probenecid (B), y en presencia tanto de FBS dializado como de probenecid (C). Comparación de la movilización de calcio en células que expresan y no expresan el receptor 5-HT_{2A} (CHO-K1 5-HT_{2A} y CHO ST, respectivamente), tras la adición de 5-HT 10 μ M (D). Los datos representan la media \pm EEM de un experimento representativo en puntos por triplicado. **p<0,01; ***p<0,001 (test t de Student).

Como control, se estudió la movilización de calcio en respuesta a 5-HT 10 μ M en células CHO-K1 sin transfectar (CHO ST). Para la línea CHO ST, no existen diferencias en la movilización de calcio entre la actividad basal y la actividad registrada tras la adición de 5-HT 10 μ M (p=0,06). Al comparar la línea CHO ST con la línea CHO-K1 5-HT_{2A}, la actividad basal es superior en presencia del receptor 5-HT_{2A} (p<0,01), si bien la estimulación con 5-HT 10 μ M

incrementa la movilización de calcio tres veces sobre la actividad basal ($p<0,001$; test t de Student) (**figura 31D**).

Se ensayaron concentraciones crecientes de tres agonistas del receptor 5-HT_{2A}: el agonista endógeno, 5-HT, y dos agonistas alucinógenos, (±)DOI, y LSD. Para todos ellos se obtuvieron curvas concentración-respuesta (**figura 32**), con potencias y eficacias similares a las descritas en la bibliografía (**tabla 7**).

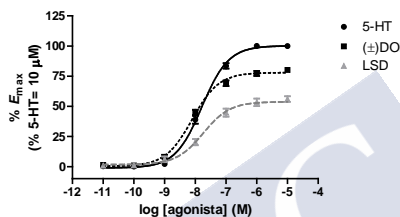


Figura 32. Movilización de calcio en células CHO-K1 5-HT_{2A} tras la adición de cantidades crecientes de 5-HT (trazo negro continuo), (±)DOI (trazo negro discontinuo) y LSD (trazo gris discontinuo). Se consideró el 100 % como la respuesta máxima a 5-HT 10 μ M. Los puntos representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Tabla 7. Potencia (EC_{50}) y eficacia (% E_{max}) de 5-HT, (±)DOI y LSD en células CHO-K1 5-HT_{2A} en el ensayo de movilización de calcio (columna izquierda) y en la bibliografía (columna derecha). Los puntos representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Ensayo de movilización de calcio			Bibliografía (164)	
	EC_{50} (nM)	% E_{max} (5-HT = 10 μ M)	EC_{50} (nM)	% E_{max} (5-HT = 10 μ M)
5-HT	19,25 \pm 5,92	100,7 \pm 2,02	16,98 \pm 0,89	100
(±)DOI	10,71 \pm 3,84	77,50 \pm 3,30	1,20 \pm 0,85	77 \pm 4
LSD	48,59 \pm 13,18	56,10 \pm 7,15	36,31 \pm 0,82	53 \pm 2

Una vez optimizado el ensayo para el estudio del comportamiento agonista, se pusieron a punto las condiciones óptimas de medida de respuesta antagonista.

Se evaluaron distintos tiempos de preincubación con antagonista de distinta naturaleza, desde 2 a 20 min, a una concentración similar a la potencia descrita en la bibliografía, y posterior adición de 5-HT a una concentración 10 μ M. Se observó que tras 2 min de incubación se alcanza una inhibición del 50 % con los antagonistas competitivos clozapina (**figura 33A**), haloperidol (**figura 33B**) y espiperona (**figura 33C**), y esta inhibición no se modificó con el tiempo.

Como control, se empleó un antagonista pseudoirreversible del receptor 5-HT_{2A}, que se caracteriza por poseer una cinética de disociación lenta. Para este antagonista se observó una inhibición tiempo dependiente: se obtuvo una inhibición del 5 % a los 7 min de preincubación; una inhibición del 10 % a los 10 min y una inhibición del 80 % a los 15 min. Con 20 min de preincubación de ritanserina, la inactivación fue completa (**figura 33D**).

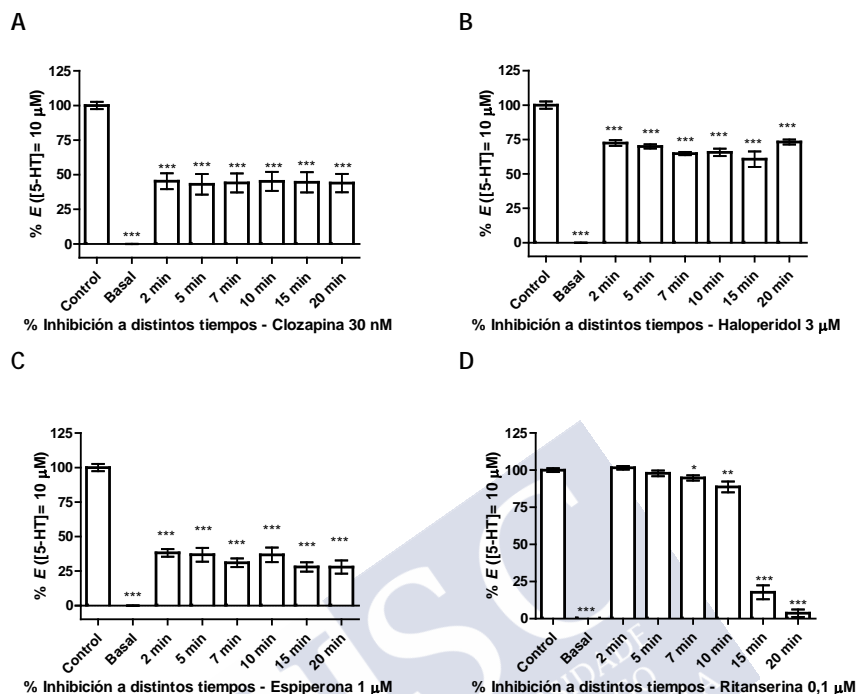


Figura 33. Movilización de calcio en células CHO-K1 5-HT_{2A} tras la adición de una concentración fija de clozapina (A), haloperidol (B), espiperona (C) y ritanserina (D) a distintos tiempos, y posterior adición de 5-HT 10 μM. Se consideró el 100 % la estimulación en ausencia de antagonista (5-HT 10 μM; control). Los puntos representan la media ± EEM de al menos dos experimentos independientes realizados en puntos por triplicado. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (test *t* de Student).

Se estudiaron concentraciones crecientes de clozapina, haloperidol y espiperona en presencia de 5-HT 0,1 μM, tras la pre-incubación de tres min con el ligando antagonista (**figura 34**). Para todos ellos se obtuvieron curvas concentración-respuesta, a partir de las cuales se obtuvo una potencia similar a la descrita en la bibliografía (120,165) (**tabla 8**).

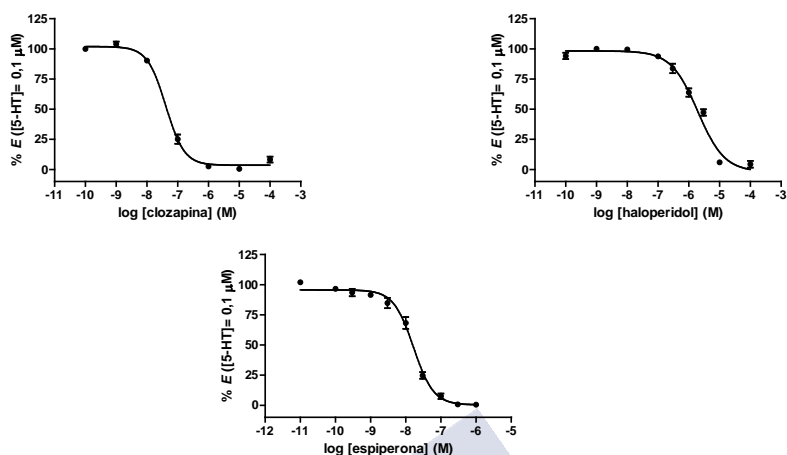


Figura 34. Curvas concentración respuesta para la movilización de calcio en células CHO-K1 5-HT_{2A} tras la administración de cantidades crecientes de clozapina, haloperidol y espiperona, posterior adición de 5-HT 0,1 μ M. Se consideró el 100 % como la respuesta del agonista en ausencia de antagonista. Los puntos representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados en puntos por triplicado.

Tabla 8. Potencia (IC₅₀ y K_B) de clozapina, haloperidol y espiperona en presencia de 5-HT 0,1 μ M. Los datos representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados en puntos por triplicado.

	IC ₅₀ (nM)	K _B (nM)
Clozapina	42,50 \pm 9,27	6,87 \pm 1,50
Haloperidol	2147 \pm 639	346,60 \pm 103,10
Espiperona	14,00 \pm 0,89	2,26 \pm 0,14

1.4.3 El tratamiento del receptor 5-HT_{2A} con DTT 20 mM alteró la transducción de señales al valorar la movilización de calcio

Una vez definido el efecto del DTT 20 mM en la unión de ligandos al receptor 5-HT_{2A}, y la alteración de la señalización intracelular medida a través de la acumulación de IPs, se valoró el efecto de dicho tratamiento en la movilización de calcio.

Con respecto a ligandos agonistas (**figura 35**), el tratamiento con DTT 20 mM disminuyó de manera estadísticamente significativa la eficacia de 5-HT, (\pm)DOI y LSD, sin alterar la potencia de ninguno de los agonistas (**tabla 9**).

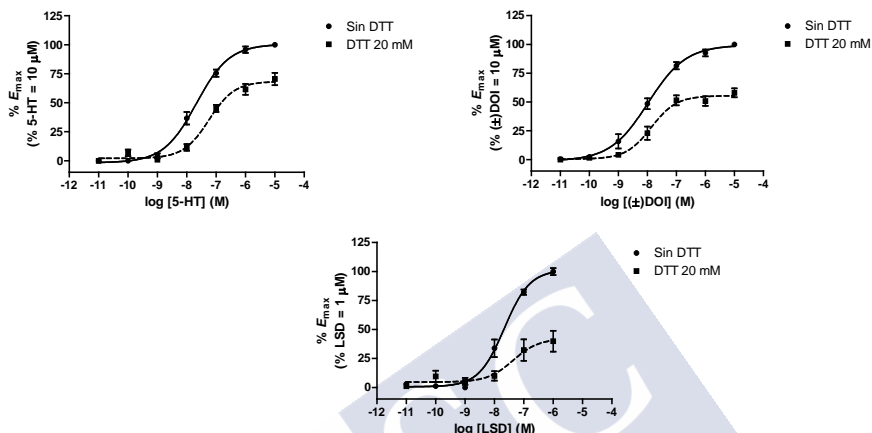


Figura 35. Curvas concentración-respuesta de movilización de calcio de los agonistas 5-HT, (\pm)DOI y LSD en células CHO-K1 5-HT_{2A}, obtenidas sin tratar (trazo continuo) y tratadas con DTT 20 mM (trazo discontinuo). Se consideró el 100 % como la respuesta máxima obtenida para cada agonista. Los puntos representan la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Tabla 9. Potencia (EC₅₀) y porcentaje de reducción de respuesta máxima a los agonistas 5-HT, (\pm)DOI y LSD para movilización de calcio, en células CHO-K1 expresando el receptor 5-HT_{2A} no tratadas y tratadas con DTT 20 mM durante 10 min a 37 °C. Los valores representan la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado.

	EC ₅₀ (nM)		% Reducción de respuesta máxima a agonista
	Sin DTT	DTT 20 mM	DTT 20 mM
5-HT	27,28 \pm 10,3	44,45 \pm 12,75	41,30 \pm 5,27
(\pm)DOI	12,32 \pm 6,79	20,40 \pm 7,88	43,42 \pm 2,97
LSD	28,57 \pm 10,40	54,60 \pm 23,80	71,76 \pm 3,94

Con respecto a los ligandos antagonistas, se evaluaron cantidades crecientes de clozapina y haloperidol en presencia de los agonistas 5-HT, (\pm)DOI y LSD a una concentración 0,1 μ M (**figura 36**). Se observó un descenso de más de un 50 % en la respuesta máxima para ambos antagonistas, independientemente del ligando agonista empleado.

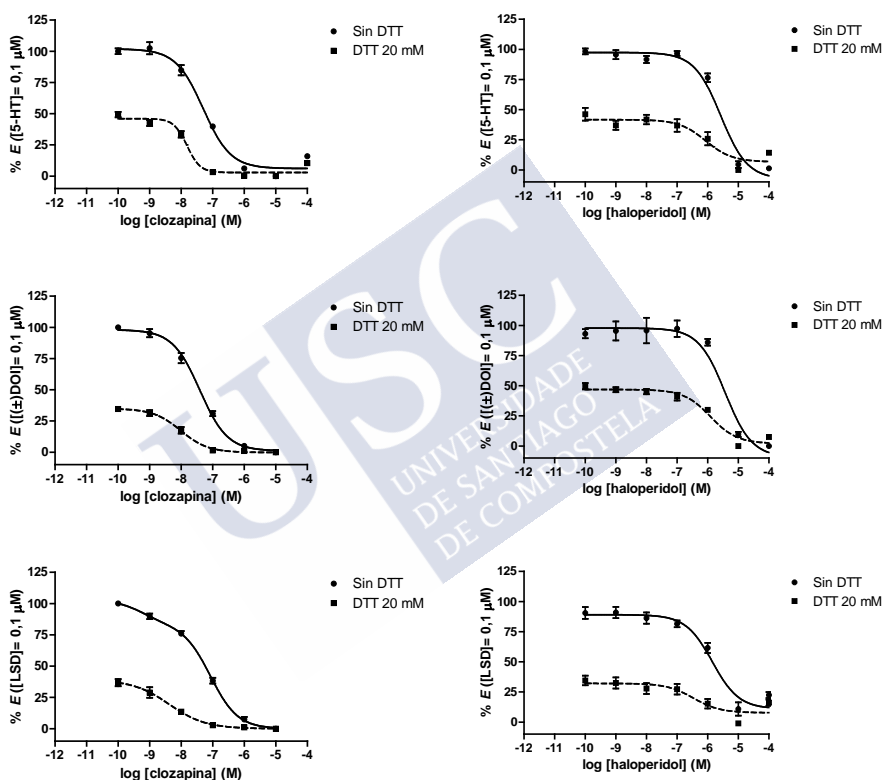


Figura 36. Curvas concentración-respuesta de movilización de calcio de los antagonistas clozapina y haloperidol en presencia de 5-HT 0,1 μ M, (\pm)DOI 0,1 μ M y LSD 0,1 μ M, en células CHO-K1 5-HT_{2A}, sin tratar (trazo continuo) y tratadas con DTT (trazo discontinuo). Se consideró el 100 % como la respuesta del agonista en ausencia del antagonista. Los puntos representan la media \pm EEM de al menos dos experimentos independientes realizados por triplicado.

El tratamiento con DTT no alteró la potencia de clozapina en presencia de 5-HT o (\pm)DOI, ni de haloperidol en presencia de 5-HT,

(\pm)DOI o LSD. El ajuste de la curva de inhibición en movilización de calcio para clozapina en presencia de LSD resultó ser bifásico. Con el tratamiento de DTT, la curva de inhibición se ajusta a una curva de solo una fase (**tabla 10**).

Tabla 10. Potencia de clozapina y haloperidol (K_B) y porcentaje de reducción de respuesta máxima a agonistas en presencia del tratamiento con DTT, para la movilización en células CHO-K1 5-HT_{2A} no tratadas y tratadas con DTT 20 mM durante 10 min a 37 °C. Los datos representan la media \pm EEM de al menos dos experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$ (test t de Student)

		K_B (nM)		% Reducción de respuesta máxima a agonista
		Sin DTT	DTT 20 mM	DTT 20 mM
Clozapina	5-HT	10,70 \pm 0,92	5,23 \pm 1,23	55,28 \pm 6,28
Haloperidol	0,1 μ M	533 \pm 76,09	248 \pm 118	53,47 \pm 6,14
Clozapina	(\pm)DOI	3,96 \pm 1,50	1,96 \pm 1,04	59,99 \pm 2,83
Haloperidol	0,1 μ M	389,4 \pm 72,39	229,30 \pm 33,72	52,51 \pm 11,44
		<i>Alta:</i> 0,09 \pm 0,03		
Clozapina	LSD	<i>Baja:</i> 184,70 \pm 100,30	1,09 \pm 0,60*	58,06 \pm 5,56
	0,1 μ M			
Haloperidol		552,30 \pm 97,53	217,50 \pm 11,50	50,70 \pm 4,46

2 LA ROTURA DEL PUENTE DISULFURO EXTRACELULAR C148^{3,25}-C227^{ECL-2} ANULA LA FARMACOLOGÍA DEL RECEPTOR 5-HT_{2A} HUMANO

Con el objeto de demostrar si el efecto ejercido por el DTT se debe a la ruptura del puente disulfuro conservado entre la cisteína 148^{3,25} (C148) y la cisteína 227^{ECL-2} (C227) del receptor 5-HT_{2A}, se propuso la generación de un modelo experimental, para posteriormente evaluar la unión de los radioligandos [³H]Ketanserina

y [^3H]LSD al receptor 5-HT_{2A} humano. Posteriormente, se evaluó la capacidad de las construcciones mutadas de producir una respuesta intracelular mediada por agonistas a dos niveles: acumulación de IPs y movilización de calcio.

2.1 Se generó un nuevo modelo para el estudio de la influencia del puente disulfuro C148^{3,25}-C227^{ECL-2} en la farmacología del receptor 5-HT_{2A} humano

Dicho modelo se basa en la generación de cuatro líneas estables que expresen de forma inducible el receptor 5-HT_{2A} mutado. Para ello, se emplearon técnicas de mutagénesis dirigida en el plásmido pcDNA5/FRT/TO *myc*-5-HT_{2A}-eYFP (plásmido WT) (**tabla 11**):

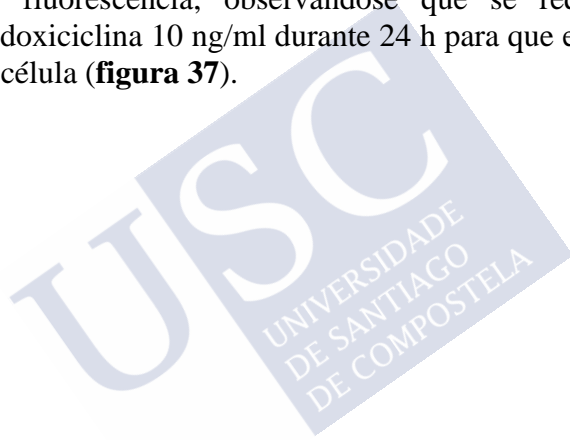
- pcDNA5/FRT/TO *myc*-5-HT_{2A}C148A-eYFP, donde la cisteína 148 del receptor 5-HT_{2A} se sustituyó por una alanina (plásmido C148A).
- pcDNA5/FRT/TO *myc*-5-HT_{2A}C227A-eYFP, donde la cisteína 227 del receptor 5-HT_{2A} se sustituyó por una alanina (plásmido C227A).
- pcDNA5/FRT/TO *myc*-5-HT_{2A}C148A/C227A-eYFP, donde las cisteínas 148 y 227 del receptor 5-HT_{2A} se sustituyeron por alaninas (plásmido C148A/C227A).

Tabla 11. Secuencia de aminoácidos obtenida en la región crítica del inserto codificante para 5-HT_{2A}, tanto para el plásmido WT, como para los plásmidos mutados C148A, C227A, C148A/C227A.

	TM-3		ECL-2	
Plásmido WT	GYRWPLPSKLC <u>A</u> AVWIYLDVLF		DDSKVFKEGSC <u>L</u> LADDNFVLI	
	138	158	217	237
Plásmido C148A	GYRWPLPSKLC <u>A</u> AVWIYLDVLF		DDSKVFKEGSC <u>L</u> LADDNFVLI	
	138	158	217	237
Plásmido C227A	GYRWPLPSKLC <u>A</u> AVWIYLDVLF		DDSKVFKEGSC <u>A</u> LLADDNFVLI	
	138	158	217	237
Plásmido C148A/C227A	GYRWPLPSKLC <u>A</u> AVWIYLDVLF		DDSKVFKEGSC <u>A</u> LLADDNFVLI	
	138	158	217	237

A partir de los plásmidos obtenidos, se generaron cuatro líneas estables inducibles. Comprobamos que dichas líneas expresan el receptor tras la incubación con doxiciclina a una concentración 10 ng/ml durante 24 h. Las líneas generadas fueron la línea Flp-InTM T-RExTM 293 *myc*-5-HT_{2A}-eYFP (células WT); la línea Flp-InTM T-RExTM 293 *myc*-5-HT_{2A}C148A-eYFP (células C148A); la línea Flp-InTM T-RExTM 293 *myc*-5-HT_{2A}C227A-eYFP (células C227A), y la línea Flp-InTM T-RExTM 293 *myc*-5-HT_{2A}C148A/C227A-eYFP (células C148A/C227A).

Se confirmó la correcta expresión de estos receptores mediante microscopía de fluorescencia, observándose que se requiere un tratamiento con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 h para que el receptor se exprese en la célula (**figura 37**).



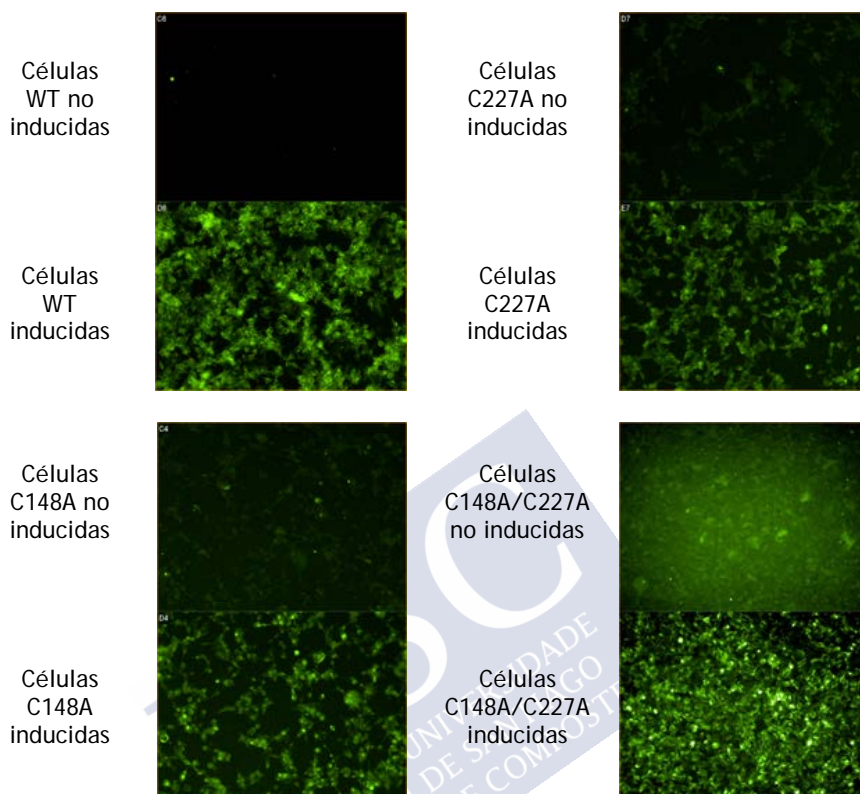


Figura 37. Inducción del receptor 5-HT_{2A} (coloración verde) con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 h. Se muestran imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia con 20 aumentos, de las cuatro líneas estables generadas: WT, C148A, C227A y C148A/C227A. Se muestra una imagen representativa de un experimento realizado en puntos por quintuplicado.

2.2 La ausencia del puente disulfuro C148^{3,25}-C227^{ECL-2} impidió la unión de [³H]Ketanserina al receptor 5-HT_{2A} humano

Una vez generadas las cuatro líneas celulares, se procedió a estudiar la capacidad de unión del receptor en ausencia del puente disulfuro conservado, usando [³H]Ketanserina como radioligando.

Se valoró la capacidad de unión del receptor 5-HT_{2A} en fracción de membrana de células que expresan el receptor WT, inducidas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 h. Con el objeto de optimizar la

cantidad de proteína, se ensayaron cantidades crecientes de proteína por pocillo: desde 60 μg a 200 μg por pocillo (**figura 38**). Al incrementar la cantidad de proteína por pocillo, el porcentaje de unión específica aumentó de 67,33 % a 85,60 % (**tabla 12**). Se determinó que 200 μg de proteína por pocillo era la cantidad óptima para la realización de posteriores experimentos.

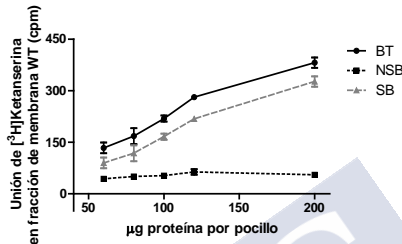


Figura 38. Unión total (BT), no específica (NSB) y específica (SB) de [^3H]Ketanserina a cantidades crecientes de proteína obtenidas de fracción de membrana de células expresando el receptor WT inducidas con doxíciclina 10 ng/ml durante 24 h. Los puntos representan la media \pm EEM de un experimento representativo realizado por triplicado.

Tabla 12. Porcentajes de unión específica (% SB) de [^3H]Ketanserina, para cantidades crecientes de proteína obtenidas de la fracción de membrana de la línea celular expresando el receptor WT inducidas con doxíciclina 10 ng/ml durante 24 h. Los valores representan la media \pm EEM de un experimento representativo realizado en puntos por triplicado.

μg de proteína por pocillo	% SB ([^3H]Ketanserina)
60	67,33
80	70,23
100	75,40
120	77,40
200	85,60

Para comprobar la unión específica de [^3H]Ketanserina de la línea que expresa el receptor 5-HT_{2A} WT, se realizaron estudios de saturación con 200 μg de proteína por pocillo (**figura 39**). La

capacidad de unión máxima resultó ser de $92,98 \pm 6,34$ fmol/mg de proteína, y la constante de disociación en el equilibrio (K_D) $0,38 \pm 0,09$ nM, del mismo orden que la descrita en bibliografía (166).

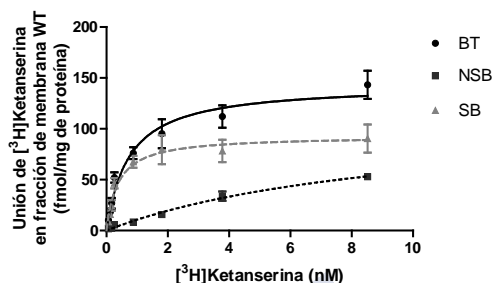


Figura 39. Unión total (BT), no específica (NSB) y específica (SB) de [³H]Ketanserina a fracción de membrana de células que expresan el receptor WT (200 µg por pocillo) inducidas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 h. Los datos representan la media \pm EEM de un experimento representativo de dos experimentos independientes, realizados en puntos por triplicado.

Una vez validada la capacidad de unión de [³H]Ketanserina a la línea WT, se procedió a evaluar la capacidad de unión de este radioligando a las líneas que expresan el receptor 5-HT_{2A} mutado: C148A, C227A y C148A/C227A. El incremento de la cantidad de proteína no implicó un aumento en la unión específica (**figura 40A, 40B y 40C**).

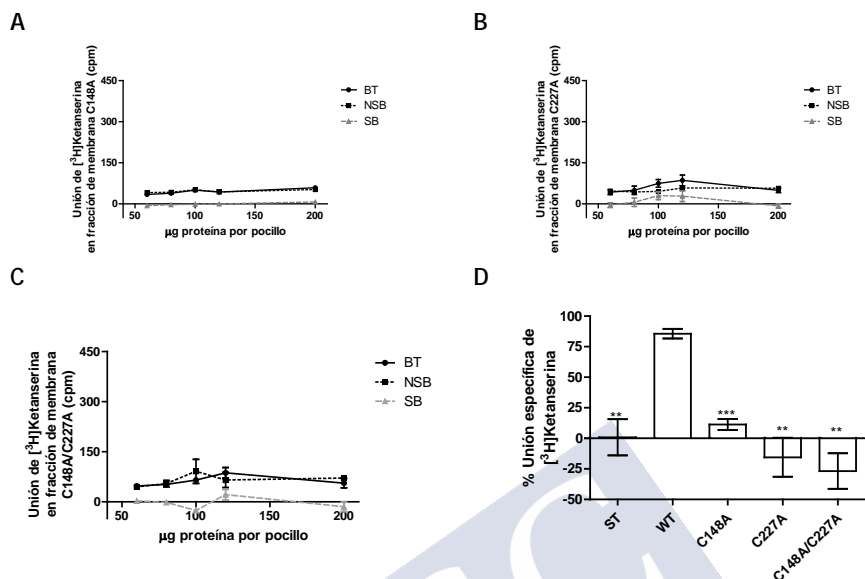


Figura 40. Unión total (BT), no específica (NSB) y específica (SB) de [^3H]Ketanserina a fracción de membrana de células que expresan el receptor C148A (A), C227A (B) o C148A/C227A (C) inducidas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24h. (D) Porcentajes de unión específica de las distintas líneas celulares a 200 µg de proteína por pocillo, y comparación con la línea que expresa el receptor WT. Los datos representan la media \pm EEM de un experimento representativo realizado por triplicado. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (test t de Student).

Al comparar la unión específica de [^3H]Ketanserina en 200 µg de proteína por pocillo (**figura 40D**) en todas las líneas celulares se comprobó que a pesar de que la unión específica de la línea que expresa el receptor WT es de un 85,60%, las líneas celulares que expresan el receptor 5-HT_{2A} mutado C148A, C227A y C148A/C227A fueron incapaces de unir de manera específica [^3H]Ketanserina, de una forma similar a la línea ST (células HEK293 sin transfectar).

Con el objeto de determinar si en célula entera se podría detectar la unión de [^3H]Ketanserina al receptor mutado independientemente de su localización en la membrana celular, se estudió la unión de [^3H]Ketanserina en célula entera que expresa el receptor WT. Para optimizar el número de células requerido, se probaron cantidades crecientes de células, desde 25000 a 100000 células por pocillo

(figura 41). A pesar de que al incrementar el número de células el porcentaje de unión específica incrementa, de 33,63 % a 54,95 %, la señal específica no fue suficiente para la realización de curvas de saturación o de competición (tabla 13).

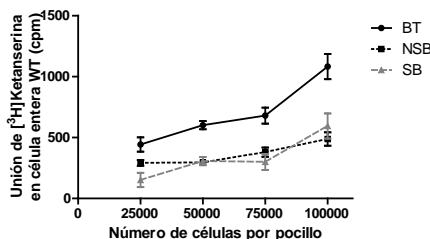


Figura 41. Unión total (BT), no específica (NSB) y específica (SB) de [^3H]Ketanserina a cantidades crecientes de células que expresa el receptor WT inducidas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 h. Los puntos representan la media \pm EEM de un experimento representativo realizado por triplicado.

Tabla 13. Porcentajes de unión específica (% SB) de [^3H]Ketanserina, para cantidades crecientes de células que expresa el receptor WT inducidas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 h. Los valores representan la media \pm EEM de un experimento representativo realizado en puntos por triplicado.

Número de células por pocillo	% SB ([^3H]Ketanserina)
25000	33,63
50000	49,03
75000	44,12
100000	54,95

2.3 La ausencia del puente disulfuro C148^{3.25}-C227^{ECL-2} impidió la unión de [^3H]LSD al receptor 5-HT_{2A} humano

Una vez comprobado que la capacidad de unión de [^3H]Ketanserina en las líneas que expresan el receptor mutado está alterada, se evaluó la capacidad de unión de [^3H]LSD en la fracción de membrana de células que expresan el receptor WT. Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron la presencia del receptor 5-HT₇ en

células HEK293, por lo que se empleó un bloqueante específico de este receptor, SB269970, para impedir la unión no específica de [³H]LSD al receptor 5-HT₇.

Con el objeto de optimizar la cantidad de proteína necesaria, se probaron cantidades crecientes de proteína, desde 60 µg a 200 µg de proteína por pocillo, en presencia de SB269970 1 µM (**figura 42**). Los porcentajes de unión específica de [³H]LSD superaron el 95 % para todas las cantidades de proteína probadas (**tabla 14**), con lo que se seleccionaron 60 µg de proteína por pocillo para la realización de posteriores experimentos.

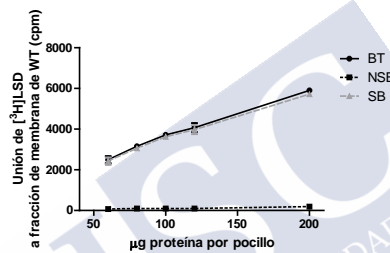


Figura 42. Unión total (BT), no específica (NSB) y específica (SB) de [³H]LSD, presencia de SB269970 1 µM, a cantidades crecientes de proteína por pocillo, obtenida de células que expresan el receptor WT inducidas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 h. Los puntos representan la media ± EEM de un experimento representativo realizado por triplicado.

Tabla 14. Porcentajes de unión específica de [³H]LSD (% SB), para cantidades crecientes de proteína obtenidas de la fracción de membrana de la línea celular que expresa el receptor WT inducida con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 h. Los valores representan la media ± EEM de un experimento representativo realizado en puntos por triplicado.

µg de proteína por pocillo	% SB ([³ H]LSD)
60	97,14
80	96,87
100	97,33
120	97,32
200	96,80

Para confirmar la unión específica del [3 H]LSD al receptor 5-HT_{2A} WT, se estudiaron cantidades crecientes de radioligando (**figura 43**). La capacidad de unión máxima resultó ser de $513,30 \pm 7,69$ fmol/mg de proteína, y la constante de disociación en el equilibrio (K_D), $0,78 \pm 0,08$ nM, similar a la descrita en la bibliografía (150).

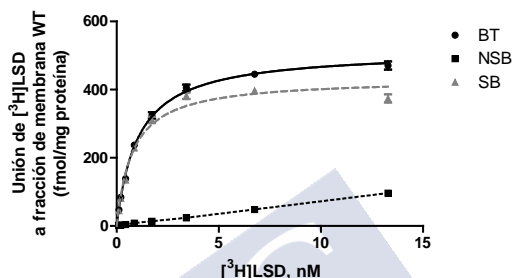


Figura 43. Unión total (BT), no específica (NSB) y específica (SB) de [3 H]LSD a fracción de membrana de células que expresan el receptor WT (60 μ g por pocillo) inducidas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 h, en presencia de SB269970 1 μ M. Los datos representan la media \pm EEM de un experimento representativo de dos experimentos independientes, realizados en puntos por triplicado.

Una vez validada la unión específica de [3 H]LSD a la fracción de membrana de la línea celular que expresa el receptor WT, se procedió a evaluar la capacidad de unión este radioligando a la fracción de membrana de las líneas que expresan el receptor mutado. Se emplearon 60 μ g de proteína por pocillo en dos condiciones: en ausencia (**figura 44A**) y presencia de SB269970 1 μ M (**figura 43B**).

La unión específica de [3 H]LSD a la fracción de membrana de células que expresa el receptor WT fue idéntica en ausencia y presencia de SB269970, del $96,05 \pm 1,00$ % y $95,78 \pm 0,76$ %, respectivamente. Las tres mutaciones del receptor 5-HT_{2A}, C148A, C227A y C148A/C227A, impidieron la unión específica de [3 H]LSD.

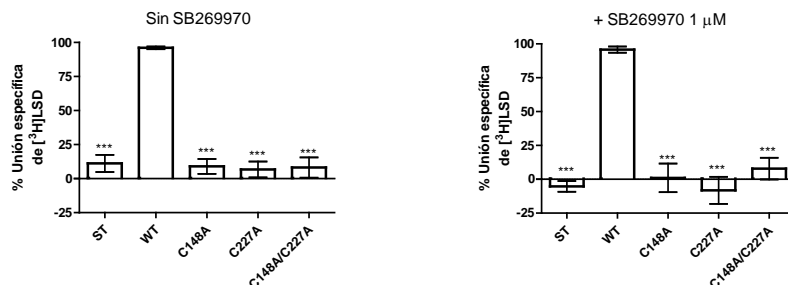


Figura 44. Porcentajes de unión específica de $[^3\text{H}]\text{LSD}$ en fracción de membrana de las líneas ST (sin transfectar), WT, C148A, C227A y C148A/C227A inducidas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 h, y realizados en ausencia o presencia de SB269970 1 μM , y comparados con la línea que expresa el receptor WT. Los valores representan la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes realizados en puntos por triplicado. *** $p < 0,001$ (test t de Student).

Con el objetivo de descartar que cantidades mayores de proteína se produjeran una unión específica de $[^3\text{H}]\text{LSD}$ al receptor mutado, se evaluó la unión específica de $[^3\text{H}]\text{LSD}$ en cantidades crecientes de proteína para las tres líneas mutadas. El incremento de la cantidad de proteína por pocillo de 60 μg a 200 μg no mostró un incremento en la unión específica de $[^3\text{H}]\text{LSD}$ (**figura 45**).

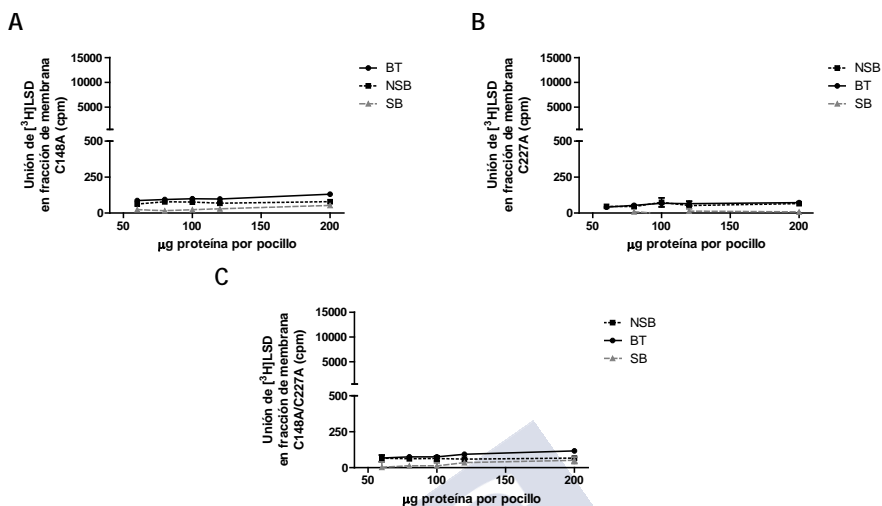


Figura 45. Unión total (BT), no específica (NSB) y específica (SB) de [³H]LSD a fracción de membrana de células que expresan el receptor 5-HT_{2A} con la mutación C148A (A), C227A (B) o C148A/C227A (C) inducidas con doxiciлина 10 ng/ml durante 24 h, en presencia de SB269970 1 µM. Los datos representan la media ± EEM de un experimento representativo realizado por triplicado.

Con el objeto de determinar si en células vivas se podría detectar unión al receptor mutado independientemente de la localización en membrana celular, se estudió la unión de [³H]LSD en célula entera expresando el receptor WT. Para optimizar el número de células requerido, se probaron cantidades crecientes de células, desde 25000 a 100000 células por pocillo en presencia de SB269970 1 µM (**figura 46**). Al incrementar el número de células por pocillo, el porcentaje de unión específica al receptor WT incrementa, de 63,68 % con 25000 células por pocillo, a 83,47 %, con 100000 células por pocillo (**tabla 15**). Se determinó una concentración celular óptima de 100000 células por pocillo para la realización de posteriores experimentos.

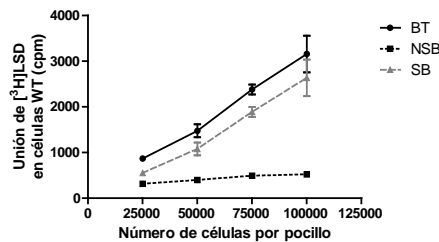


Figura 46 Unión total (BT), no específica (NSB) y específica (SB) de $[^3\text{H}]\text{LSD}$, presencia de SB269970 1 μM , a cantidades crecientes de células que expresan el receptor WT, inducidas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 h. Los puntos representan la media \pm EEM de un experimento representativo realizado por triplicado.

Tabla 15. Porcentajes de unión específica de $[^3\text{H}]\text{LSD}$, para cantidades crecientes de células WT inducidas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 h. Los valores representan la media \pm EEM de un experimento representativo realizado en puntos por triplicado.

Número de células por pocillo	% SB ($[^3\text{H}]\text{LSD}$)
25000	63,68
50000	73,03
75000	79,34
100000	83,47

Para confirmar la unión específica de $[^3\text{H}]\text{LSD}$ al receptor 5-HT_{2A}, se estudió el desplazamiento de $[^3\text{H}]\text{LSD}$ con cantidades crecientes de risperidona, en células que expresan el receptor WT (figura 47) y SB269970 1 μM . La afinidad de la risperidona resultó ser 0,21 nM, similar a la descrita en la bibliografía (167).

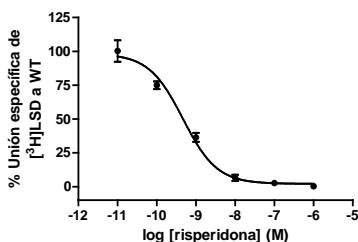


Figura 47. Desplazamiento de $[^3\text{H}]\text{LSD}$ por risperidona en células que expresan el receptor WT (100000 células por pocillo), tras la incubación con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 h. La curva concentración-respuesta se realizó en presencia de SB269970 1 μM . Los puntos representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados en puntos por duplicado.

A continuación, se procedió a evaluar la capacidad de unión este radioligando a las líneas mutadas. Se emplearon 100000 células por pocillo llevando a cabo los ensayos en ausencia y presencia de SB269970 1 μM (**figura 48**).

La unión específica de $[^3\text{H}]\text{LSD}$ en células expresando el receptor WT fue idéntica en ausencia y presencia de SB269970, del $81,10 \pm 2,76$ % y $78,76 \pm 5,70$ %, respectivamente. Las tres mutaciones del receptor 5-HT_{2A} (C148A, C227A y C148A/C227A) provocaron la incapacidad del receptor 5-HT_{2A} de unir de manera específica $[^3\text{H}]\text{LSD}$, disminuyendo los porcentajes de SB a valores similares a los obtenidos para la línea sin transfectar, ST.

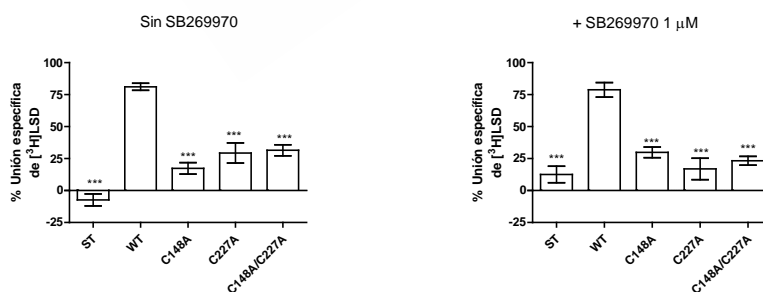


Figura 48. Porcentajes de unión específica de $[^3\text{H}]\text{LSD}$ a célula entera, realizados en ausencia o presencia de SB269970 1 μM , comparado con SB a la línea expresando el receptor WT. Los valores representan la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes realizados en puntos por triplicado. *** $p < 0,001$ (test *t* de Student).

2.4 La señalización mediada por el receptor 5-HT_{2A} se anuló en ausencia del puente disulfuro C148^{3,25}-C227^{ECL-2}

Para la evaluación del efecto de la rotura del puente disulfuro conservado en la señalización intracelular mediada por PLC, se hicieron dos medidas: medida de acumulación de IPs y medida de movilización de calcio.

El ensayo de acumulación de IPs se optimizó en células que expresan el receptor WT. El incremento de células por pocillo, de 25000 a 100000, implicó un aumento de la acumulación de IPs específica, medida como la razón entre respuesta a 5-HT 100 μ M (estimulado) y respuesta basal (**figura 49A**). Se escogieron 75000 células por pocillo para la realización de los posteriores experimentos, al obtenerse una razón estimulado/basal de 11,74 (**tabla 16**).

Para valorar la especificidad de la respuesta, se hicieron estudios en ausencia (no inducido) y presencia de doxíciclina 10 ng/ml. En ausencia de doxíciclina, la adición de 5-HT en células WT no implicó un aumento de la acumulación de IPs con respecto al basal ($p=0,051$; test t de Student). A su vez, la respuesta basal obtenida en células WT tras la inducción con doxíciclina 10 ng/ml durante 24 h permaneció inalterada, si bien la incubación con 5-HT 100 μ M en células WT inducidas produjo un incremento estadísticamente significativo ($p<0,001$; test t de Student) en la movilización de IPs, con respecto al basal inducido y a células estimuladas con 5-HT no inducidas (**figura 49B**).

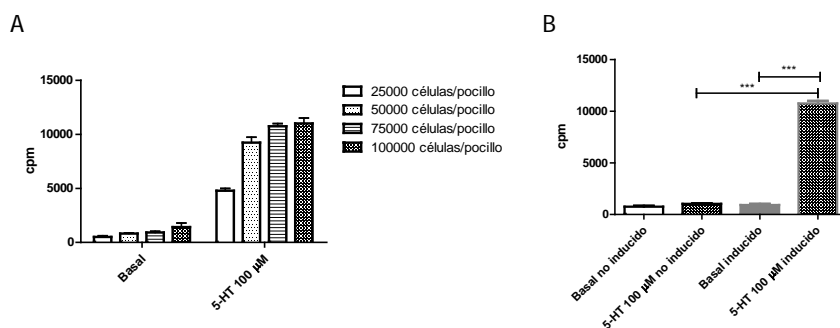


Figura 49. Acumulación de IPs en células que expresan el receptor WT en cpm. (A) Representación de la acumulación de IPs en cantidades crecientes de células por pocillo, tras la inducción con 10 ng/ml de doxíciclina durante 24 h, sin estimular (basal) y tras la adición de 5-HT 100 µM. (B) Respuesta a 5-HT en ausencia (no inducido) o presencia (inducido) de tratamiento con doxíciclina 10 ng/ml durante 24 h, con 75000 células por pocillo. Los datos representan la media \pm EEM de un experimento representativo realizado en puntos por triplicado. *** $p < 0,001$ (test t Student).

Tabla 16. Razón de respuesta de la acumulación de IPs en presencia de 5-HT 100 µM (estimulado) y la respuesta basal, con cantidades crecientes de células por pocillo. Los valores representan la media de un experimento representativo realizado en puntos por triplicado.

Número de células por pocillo	Estimulado/Basal
25000	9,37
50000	11,31
75000	11,74
100000	7,74

Se evaluaron la potencia y eficacia de los agonistas 5-HT, (\pm)DOI y LSD en acumulación de IPs, en la línea que expresa el receptor WT, en función del porcentaje de respuesta máxima de 5-HT (**figura 50**). En cuanto a la eficacia, los agonistas alucinógenos se comportaron como agonistas parciales, al igual que en la línea CHO-K1. La potencia de (\pm)DOI se mantuvo inalterada con respecto a la obtenida en la línea CHO-K1 (55,21 nM en células CHO-K1 frente a 33,43 nM en células WT; $p = 0,59$, test t de Student); así como la potencia del

LSD (2,90 nM en células CHO-K1 frente a 0,37 nM en células WT; $p=0,29$, test t de Student) (**tabla 17**). Sin embargo, la potencia de 5-HT resultó ser mayor en células WT (359 nM en células CHO-K1 frente a 19,59 nM en células WT; $p<0,01$, test t de Student).

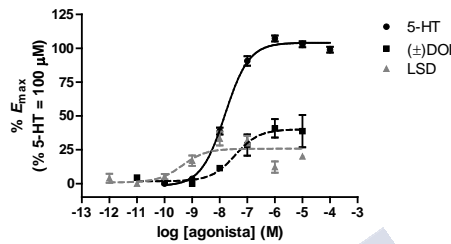


Figura 50. Curvas concentración-respuesta de 5-HT, (±)DOI y LSD para la acumulación de IPs en células WT inducidas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 h, representado como el porcentaje de respuesta máxima a 5-HT. Los puntos representan la media \pm EEM de al menos dos experimentos independientes realizados en puntos por triplicado.

Tabla 17. Potencia (EC_{50}) y eficacia (% E_{max}) de 5-HT, (±)DOI y LSD, al valorar acumulación de IPs en la línea que expresa el receptor WT. Los valores representan la media \pm EEM de dos experimentos independientes realizados en puntos por triplicado.

	EC_{50} (nM)	% E_{max} (5-HT 10 μ M)
5-HT	$19,59 \pm 3,51$	$101,8 \pm 1,62$
(±)DOI	$33,43 \pm 12,05$	$40,04 \pm 14,75$
LSD	$0,37 \pm 0,17$	$25,60 \pm 8,34$

Con respecto a los ligandos antagonistas, se determinó la potencia de clozapina y haloperidol en presencia de (±)DOI 0,1 μ M (**figura 51**). La potencia de la clozapina resultó ser $12,23 \pm 4,17$ nM, y la del haloperidol, $628,90 \pm 100,20$ nM, ambas de igual magnitud que las obtenidas en células CHO-K1 ($p=0,77$ y $p=0,08$, respectivamente; test t de Student).

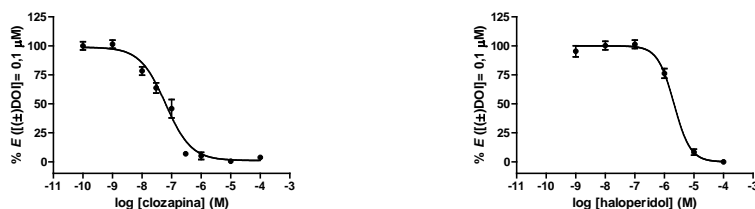


Figura 51. Acumulación de IPs en células que expresan el receptor WT inducidas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 h, tras la adición de cantidades crecientes de clozapina y haloperidol, y posterior adición de (\pm) DOI 0,1 μ M. Los puntos representan la media \pm EEM de dos experimentos independientes realizados en puntos por triplicado.

Una vez caracterizada la línea que expresa el receptor WT, se estudió el efecto de las mutaciones en la acumulación de IPs en respuesta a los tres agonistas: 5-HT 100 μ M, (\pm) DOI 1 μ M y LSD 1 μ M (**figura 52**). No se observó respuesta del receptor 5-HT_{2A} en presencia de las mutaciones C148A, C227A y C148A/C227A para ninguno de los agonistas utilizados (**tabla 18**).

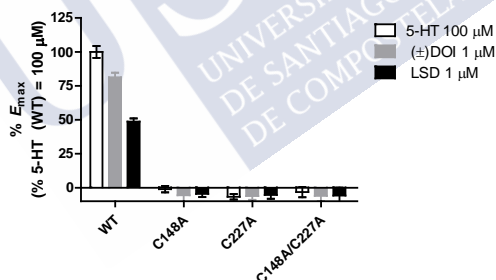


Figura 52. Porcentajes de acumulación de IPs en las líneas que expresan el receptor WT, C148A, C227A y C148A/C227A, representado como el porcentaje de respuesta de la línea expresando el receptor WT a 5-HT 100 μ M, tras la inducción durante 24 h del receptor con doxiciclina 10 ng/ml. Los valores representan la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes realizados en puntos por triplicado.

Tabla 18. Eficacia (% E_{\max}) de los agonistas 5-HT, (\pm)DOI y LSD para la acumulación de IPs en las distintas líneas celulares. Se comparó el efecto ejercido por cada agonista en las líneas expresando el receptor mutado con la línea expresando el receptor WT. Los valores representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados en puntos por triplicado. *** $p < 0,001$ (test t de Student).

	% E_{\max} (5-HT (WT) = 100 μ M)		
	5-HT 100 μ M	(\pm)DOI 1 μ M	LSD 1 μ M
WT	100,00 \pm 4,37	81,27 \pm 3,35	48,69 \pm 2,32
C148A	-1,04 \pm 2,39***	-5,59 \pm 4,70***	-4,50 \pm 2,35***
C227A	-6,67 \pm 2,04***	-6,10 \pm 2,89***	-5,36 \pm 2,77***
C148A/C227A	-3,22 \pm 3,76***	-5,96 \pm 3,85***	-5,82 \pm 5,93***

Para la caracterización de la movilización de calcio en la línea que expresa el receptor WT, se sembraron cantidades crecientes de células por pocillo en presencia de doxiciclina 10 ng/ml y, 24 h después, se midió la respuesta en presencia de 5-HT 1 μ M.

El incremento de células por pocillo, de 15000 a 60000 implicó un aumento de la movilización de calcio específica, medida como la razón entre respuesta a 5-HT 1 μ M (estimulado) y respuesta basal (**figura 53A**). Se escogieron 60000 células por pocillo para la realización de los posteriores experimentos, al obtenerse una razón estimulado/basal de 16,28 (**tabla 19**).

Para valorar la especificidad de la señal obtenida, se hicieron estudios en presencia (inducido) y ausencia (no inducido) de receptor. La adición de 5-HT 1 μ M en ausencia de receptor demostró un incremento estadísticamente significativo en la movilización de calcio intracelular ($p < 0,001$; test t de Student) con respecto al basal. No obstante, la respuesta a 5-HT obtenida en presencia de receptor fue 3 veces superior a la obtenida en ausencia de receptor ($p < 0,001$; test t de Student), y a su vez superior a la actividad basal ($p < 0,001$; test t de Student) (**figura 53B**).

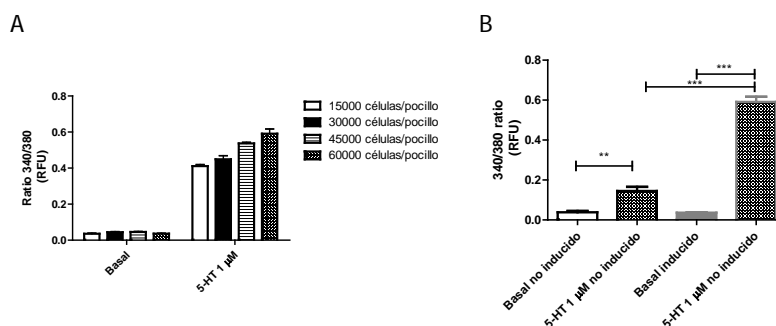


Figura 53. Movilización de calcio en células que expresan el receptor WT, representado como la razón de emisión 340/380. (A) Representación de la movilización de calcio en cantidades crecientes de células por pocillo tras la inducción con 10 ng/ml de doxíciclina durante 24 h, sin estimular (basal) y tras la adición de 5-HT 1 μ M. (B) Respuesta a 5-HT en ausencia (no inducido) o presencia (inducido) de tratamiento con doxíciclina 10 ng/ml durante 24 h, con 60000 células por pocillo. Los datos representan la media \pm EEM de un experimento representativo realizado en puntos por triplicado. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (test t Student).

Tabla 19. Razón de respuesta de la movilización de calcio en presencia de 1 μ M de 5-HT (estimulado) y la respuesta basal, con cantidades crecientes de células por pocillo y tratamiento con doxíciclina 10 ng/ml durante 24 h. Los valores representan la media de un experimento representativo realizado en puntos por triplicado.

Número de células por pocillo	Estimulado/Basal
15000	11,40
30000	10,06
45000	11,67
60000	16,28

Se estudió la capacidad de movilizar calcio por parte de los agonistas en células que expresan el receptor WT (**figura 54**). La potencia de los tres agonistas fue de igual magnitud que la obtenida en células CHO-K1 5-HT_{2A} (**tabla 17**). En cuanto a eficacia, (\pm)DOI y LSD se comportaron como agonistas parciales, al igual que en las células CHO-K1 5-HT_{2A}.

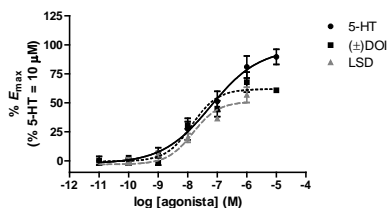


Figura 54. Movilización de calcio en células que expresan el receptor WT inducidas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 h, representado como el porcentaje de respuesta máxima a 5-HT. Curvas concentración-respuesta de 5-HT, (±)DOI y LSD. Los puntos representan la media \pm EEM de al menos dos experimentos independientes realizados en puntos por triplicado.

Tabla 17. Potencia (EC_{50}) y eficacia (% E_{max}) de 5-HT, (±)DOI y LSD, para la movilización de calcio, en células que expresan el receptor WT inducidas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 h. Los valores representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados en puntos por triplicado.

	EC_{50} (nM)	% E_{max} (5-HT 10 μ M)
5-HT	$37,73 \pm 12,47$	$99,66 \pm 6,88$
(±)DOI	$6,74 \pm 2,67$	$55,77 \pm 4,96$
LSD	$5,14 \pm 1,73$	$49,76 \pm 3,68$

Con respecto a ligandos antagonistas, se determinó la potencia de clozapina y haloperidol en presencia de (±)DOI 0,1 μ M (**figura 55**). La potencia de la clozapina resultó ser $2,90 \pm 1,32$ nM, y la del haloperidol, de $193 \pm 61,50$ nM, ambas de igual magnitud que las obtenidas en células CHO-K1 ($p=0,73$ y $p=0,71$, respectivamente; test t de Student).

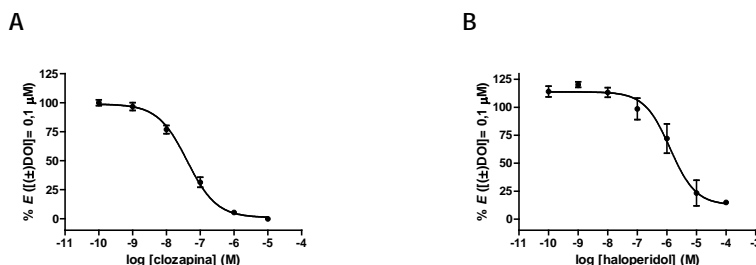


Figura 55. Movilización de calcio en células expresando el receptor WT inducidas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 h, tras la adición de cantidades crecientes de clozapina (A) y haloperidol (B), y posterior adición de (±)DOI 0,1 μ M. Los puntos representan la media \pm EEM de dos experimentos independientes realizados en puntos por triplicado.

Para estudiar la posible implicación del receptor 5-HT₇ endógeno en la medida de movilización de calcio en las líneas mutadas, se construyó una curva concentración-respuesta de 5-HT en presencia de SB269970, en células expresando el receptor WT. El empleo de SB269970 1 μ M no modificó la potencia de 5-HT ($40,56 \pm 11,80$ nM frente a $59,98 \pm 23,83$ nM en presencia de SB269970). La respuesta máxima se mantuvo inalterada (**figura 56**).

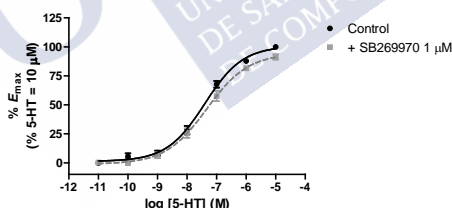


Figura 56. Movilización de calcio en células que expresan el receptor WT inducidas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 h, representado como el porcentaje de respuesta máxima a 5-HT, en ausencia (trazo continuo negro) y presencia de SB269970 1 μ M. Los puntos representan la media \pm EEM de al menos dos experimentos independientes realizados en puntos por triplicado.

Una vez caracterizada la línea que expresa el receptor WT, se estudió el efecto de las mutaciones en la movilización de calcio en respuesta a los tres agonistas, 5-HT, (±)DOI y LSD, a una concentración 1 μ M (**figura 57**). No se observó respuesta del receptor 5-HT_{2A} en presencia de las mutaciones C148A, C227A y C148A/C227A para ninguno de los agonistas utilizados (**tabla 20**).

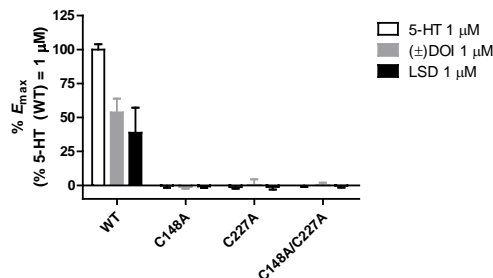


Figura 57. Movilización de calcio en las líneas WT, C148A, C227A y C148A/C227A, representado como el porcentaje de respuesta de WT a 5-HT 1 μ M, tras la inducción con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 h. Los valores representan la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes realizados en puntos por triplicado.

Tabla 20. Eficacia (% E_{max}) para la movilización de calcio de los agonistas 5-HT, (\pm)DOI y LSD en las distintas líneas celulares inducidas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 h, en ausencia y presencia de SB269970 1 μ M. Se comparó el efecto ejercido por cada agonista en las líneas que expresan el receptor mutado con la línea que expresa el receptor WT. Los valores, normalizados al 100 % de la respuesta de WT a 5-HT, representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes realizados en puntos por triplicado. *** $p < 0,001$ (test t de Student).

	% E_{max} (5-HT (WT) = 1 μ M)		
	5-HT 1 μ M	(\pm)DOI 1 μ M	LSD 1 μ M
WT	99,94 \pm 4,01	53,76 \pm 10,12	38,82 \pm 18,41
C148A	-0,25 \pm 1,46***	-1,14 \pm 1,31***	-0,75 \pm 1,18***
C227A	-1,25 \pm 1,17***	0,30 \pm 4,11***	-1,12 \pm 2,00***
C148A/C227A	-0,04 \pm 1,08***	0,07 \pm 1,92***	-0,24 \pm 1,37***

3 LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR 5-HT_{2A} EN LA MEMBRANA CELULAR ES DEPENDIENTE DEL PUENTE C148^{3,25}-C227^{ECL-2}

Con el objeto de estudiar el efecto de las mutaciones en el tráfico a membrana del receptor, se utilizaron técnicas de microscopía de fluorescencia en las cuatro líneas generadas: la línea que expresa el receptor WT y las líneas que expresan el receptor mutado C148A,

C227A y C148A/C227A. La expresión del receptor (**figura 58**, coloración verde) se indujo con un tratamiento de 24 h con doxíciclina 10 ng/ml. El núcleo se tiñó el núcleo con Hoechst 33342 (**figura 58**, coloración azul), y el retículo con ER *tracker* (**figura 58**, coloración roja).

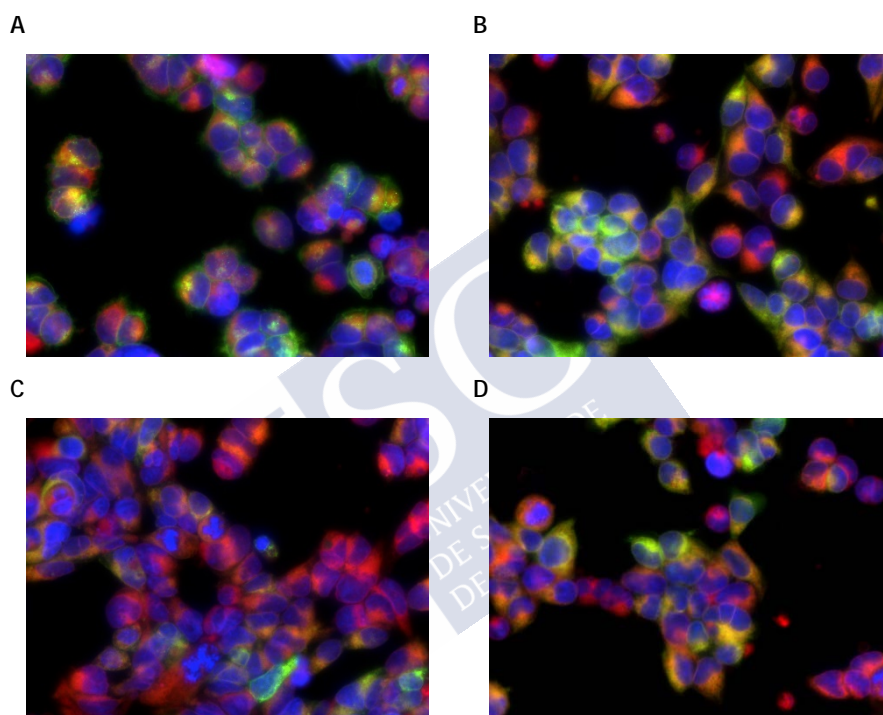


Figura 58. Imágenes de fluorescencia resultado de la tinción de las líneas expresando el receptor 5-HT_{2A} WT (A), y con las mutaciones C148A (B), C227A (C) y C148A/C227A (D) con Hoechst 33342 (coloración azul), ER *tracker* (coloración roja), e inducidas con doxíciclina 10 ng/ml durante 24 h (receptor con coloración verde). Microfotografías representativas tomadas con el objetivo de 60 aumentos de al menos seis experimentos realizados en puntos por septuplicado.

En cuanto a la expresión del receptor en la célula, se consideró como el 100 % la intensidad total medida en las células que expresan el receptor WT. Para las líneas que expresan el receptor mutado C148A y C148A/C227A se obtuvieron expresiones similares al

receptor nativo. Sin embargo, la mutación C227A conllevó un descenso en la expresión con respecto al receptor WT (**figura 59A**)

Con relación al tráfico del receptor a membrana, se midió la intensidad de fluorescencia en la membrana celular, y se consideró la intensidad de receptor en la membrana del WT como el 100 %. Se observó un descenso en la cantidad de receptor presente en la membrana plasmática de los receptores mutados, siendo este de un $39,86 \pm 1,65$ % para el receptor con la mutación C148A; de un $18,73 \pm 1,19$ % para el receptor con la mutación C227A; y del $47,71 \pm 2,56$ % para el receptor con la mutación C148A/C227A (**figura 59B**).

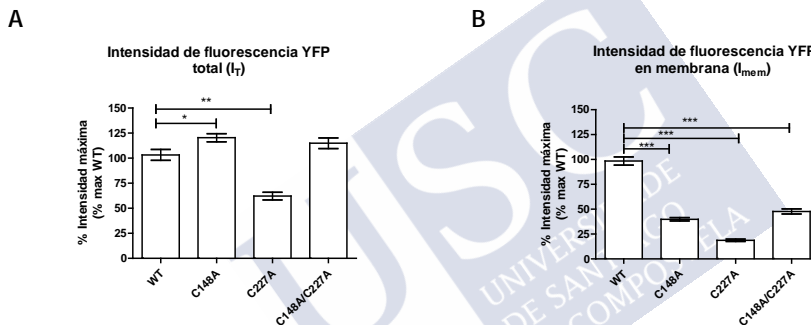


Figura 59. (A) Medida de la intensidad de fluorescencia emitida por eYFP en toda la célula (intensidad de fluorescencia total, I_T , y (B) en membrana (intensidad de fluorescencia en membrana, I_{mem} , tras la inducción del receptor con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 h en las distintas líneas celulares. Los datos representan la media \pm EEM de al menos seis experimentos independientes realizados en puntos por septuplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,001$ (test t Student).

Para evaluar si los receptores mutados tienen un tráfico a membrana truncado debido a que se quedan retenidos en el retículo endoplasmático, se estudió la colocación del receptor en retículo, expresándose como la razón entre la intensidad eYFP medida en retículo e intensidad total. La relación de intensidades del receptor en retículo con respecto a la intensidad total de los receptores mutados resultó ser similar a la del receptor nativo (**figura 60**).

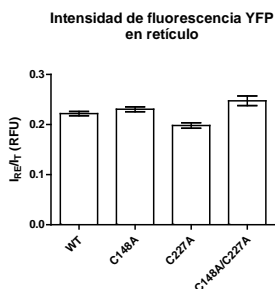


Figura 60. Medida de la intensidad de fluorescencia eYFP en retículo (I_{RE}/I_T), tras la inducción del receptor con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 h en las distintas líneas celulares. Los datos representan la media \pm EEM de al menos seis experimentos independientes realizados en puntos por septuplicado.

4 EL PUENTE DISULFURO C148^{3,25}-C227^{ECL-2} NO CONDICIONA LA NATURALEZA HOMODIMÉRICA DEL RECEPTOR 5-HT_{2A} HUMANO

A partir de las cuatro construcciones generadas incapaces de mantener el puente disulfuro conservado, se estudió la capacidad del receptor 5-HT_{2A} de homodimerizar en célula entera (BRET) y en lisados de células (Western Blot).

4.1 El receptor 5-HT_{2A} permaneció en forma oligomérica en ausencia del puente disulfuro conservado

Con el objeto de estudiar la oligomerización del receptor 5-HT_{2A} en ausencia del puente disulfuro conservado, se hicieron transfecciones transitorias de plásmidos conteniendo la mutación en células HEK293T/17 vivas para realizar ensayos de BRET.

Se estudiaron cantidades crecientes de ADN codificante del receptor ligado a eYFP, desde 1,25 μ g de ADN por pocillo hasta 100 μ g de ADN por pocillo, con una cantidad fija de ADN codificante del receptor ligado a RLuc, 1,25 μ g de ADN por pocillo, para el receptor no mutado (**figura 61**; WT, trazo negro), para el receptor con la cisteína 148 mutada en alanina (**figura 61**; C148A, trazo rojo), para el receptor con la cisteína 227 mutada en alanina (**figura 61**; C227A; trazo azul) y para el doble mutante (**figura 61**; C148A/C227A; trazo verde). Se obtuvo en los cuatro casos una curva hiperbólica que

demonstró que ninguna de las mutaciones compromete el estado oligomérico del receptor en células vivas, si bien la avidéz de los protómeros del dímero formado entre el receptor C148A fue menor que la del receptor WT (tabla 21).

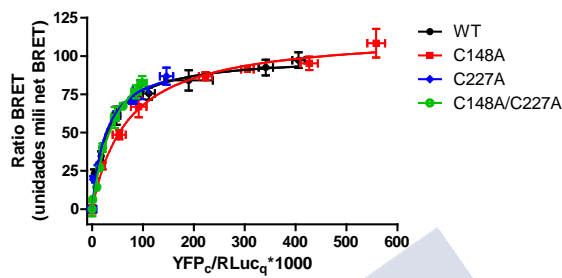


Figura 61. Ensayos de BRET de saturación llevados a cabo para el receptor 5-HT_{2A} nativo (WT), para el receptor 5-HT_{2A} con la cisteína 148 mutada en alanina (C148A), para el receptor 5-HT_{2A} con la cisteína 227 mutada en alanina (C227A), y para el receptor 5-HT_{2A} con las dos cisteínas mutadas (C148A/C227A), en células HEK293T/17. Los puntos representan la media ± EEM de un experimento representativo de al menos tres experimentos independientes realizados en puntos por cuadruplicado.

Tabla 21. Valores de BRET₅₀ y BRET_{max} obtenidos con las transfecciones transitorias de los plásmidos WT, C148A, C227A y C148A/C227A. Se consideró el BRET_{max} de la línea que expresan el receptor WT como el 100 %. Los valores representan la media ± EEM de tres experimentos independientes realizados en puntos por cuadruplicado. **p<0,01 (test *t* de Student).

	BRET ₅₀	BRET _{max} (mili net BRET)
WT	31,79 ± 3,31	100,10 ± 0,08
C148A	81,90 ± 12,45**	121,60 ± 4,17**
C227A	25,08 ± 3,27	91,19 ± 9,07
C148A/C227A	40,25 ± 6,94	143,40 ± 21,72

La expresión del receptor mutado C227A y C148A/C227A está reducida, pues la hipérbola construida con estos dos plásmidos no alcanza la asíntota BRET_{max}. Para estudiar si al incrementar la cantidad de receptor ligado a eYFP se conseguía aumentar la razón de

expresiones, medida como eYFP/RLuc, se aumentó la cantidad de ADN por pocillo de 100 a 150 μ g de ADN/punto.

Al aumentar la cantidad del ADN transfectado, el BRET_{max} se mantiene igual con 100 μ g de ADN por pocillo que con 150 μ g, siendo el BRET_{max} del receptor C148A mayor (test *t* de Student; **figura 62A**). Además, al aumentar la cantidad de ADN transfectado, aumenta la expresión en las cuatro construcciones. Se demuestra que el receptor mutado C227A y C148A/C227A se expresan con mayor dificultad que WT (test *t* de Student, **figura 62B**).

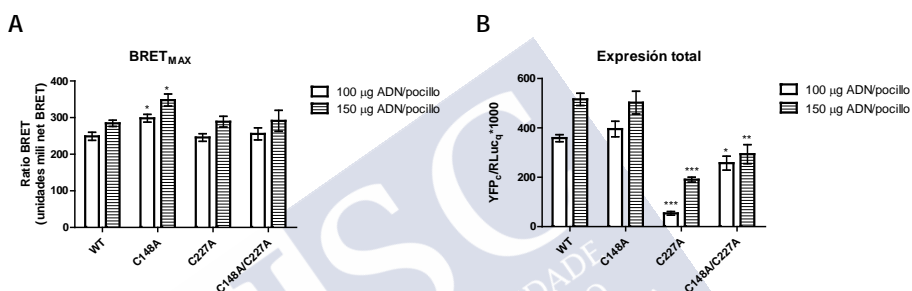


Figura 62. (A) Representación de los valores de BRET_{max} obtenidos al transfectar con 100 μ g de ADN por pocillo y 150 μ g de ADN por pocillo, experimento representativo realizado en puntos por cuadruplicado. (B) Representación de los valores de expresión total expresado como la razón de emisiones eYFP/RLuc, al transfectar con 100 μ g de ADN por pocillo y 150 μ g de ADN por pocillo. Los puntos representan la media \pm EEM de un experimento representativo realizado en puntos por cuadruplicado. **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001 (test *t* de Student).

4.2 La homodimerización del receptor 5-HT_{2A} resultó ser independiente de la formación de puentes disulfuro extracelulares

Con el objeto de dilucidar el papel del puente disulfuro conservado en la homodimerización del receptor 5-HT_{2A}, se hicieron lisados de las líneas celulares que expresan el receptor WT, C148A, C227A y C148A/C227A, junto con un lisado de células HEK293 sin transfectar (ST). El Western Blot resultante de este lisado demostró que ninguna de las tres mutaciones compromete la naturaleza homodimérica del receptor, al observarse dos bandas: la del receptor monomérico, de aproximadamente 75 KDa, y la del receptor dimérico,

de aproximadamente 150 KDa (**figura 63A**). No se observaron bandas de mayor peso molecular que indiquen la oligomerización del receptor.

Para estudiar el efecto de la reducción inespecífica de la región extracelular del receptor 5-HT_{2A} en su homodimerización, se trataron las células que expresan el receptor WT con DTT 20 mM durante 10 min a 37 °C. La exposición de células a DTT no modificó la naturaleza dimérica del receptor 5-HT_{2A}, al observarse dos bandas en el Western Blot: la banda del monómero de 75 KDa, y la banda del dímero, de 150 KDa (**figura 63B**).

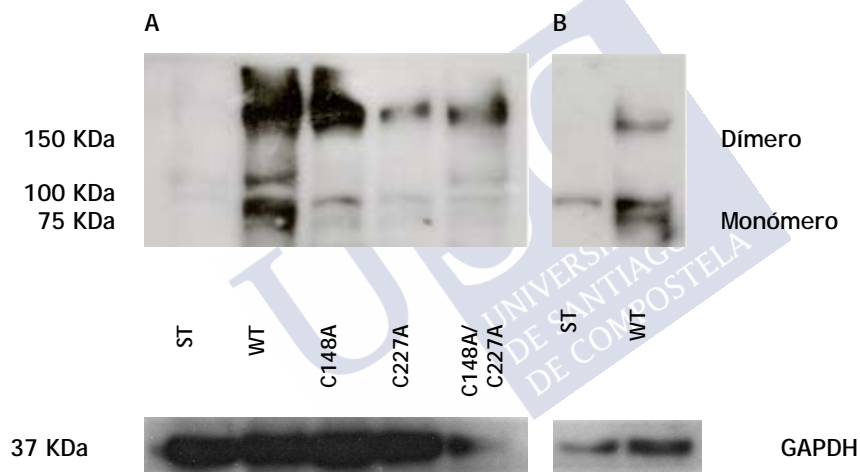


Figura 63. (A) Western Blot del lisado de células ST, WT, C148A, C227A y C148A/C227A. (B) Western Blot del lisado de células ST y WT expuesto a un tratamiento de DTT 20 mM durante 10 min a 37 °C. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes.



DISCUSIÓN



El principal hallazgo de la presente tesis doctoral fue que el puente disulfuro formado entre las cisteínas C148^{3.25} y C227^{ECL-2} en el receptor 5-HT_{2A} humano homodimérico condiciona la unión de ligandos a dicho receptor. Este hecho corrobora que este puente disulfuro tiene un papel clave para la operatividad farmacológica del homodímero del receptor 5-HT_{2A} humano.

El receptor 5-HT_{2A} de serotonina es un GPCR y, como tal, presenta un puente disulfuro entre TM-3 y ECL-2, conservado en más del 90 % de los GPCRs (57,63). Además de este puente disulfuro, las cisteínas presentes en la cara extracelular de los GPCRs permiten la formación de puentes disulfuro que participan en estabilización de múltiples estados conformacionales del receptor susceptibles de unir ligandos.

El estudio exhaustivo de la formación de otros puentes disulfuro extracelulares en GPCRs de clase A permitió clasificarlos en seis grupos que comparten características estructurales. En el receptor de rodopsina (**figura 64A**) solo existe el puente disulfuro C^{3.25}-C^{ECL-2}; en otros GPCRs se pueden formar puentes disulfuro adicionales: entre C^{N-term}-C^{ECL-2}, como es el caso de GPR39 o el receptor de gonadotropina GnRH (**figura 64B**); entre C^{N-term}-C^{ECL-3}, como en los receptores de angiotensina 1 y de angiotensina 2 (AT₂), o los receptores de la familia de citoquinas (**figura 64C**) o entre C^{ECL-2}-C^{ECL-2}, un puente disulfuro intra-hélice, como en la familia de receptores adrenérgicos β (**figura 64D**). Además, existe una serie de receptores en los que el puente disulfuro C^{3.25}-C^{ECL-2} no está presente, como es el caso de los receptores de melanocortina, que solo presentan un puente disulfuro intra-hélice C^{ECL-3}-C^{ECL-3} (**figura 64E**), o un puente disulfuro intra-hélice C^{ECL-2}-C^{ECL-2}, como es el caso de los receptores cannabinoides (**figura 64F**) (66).

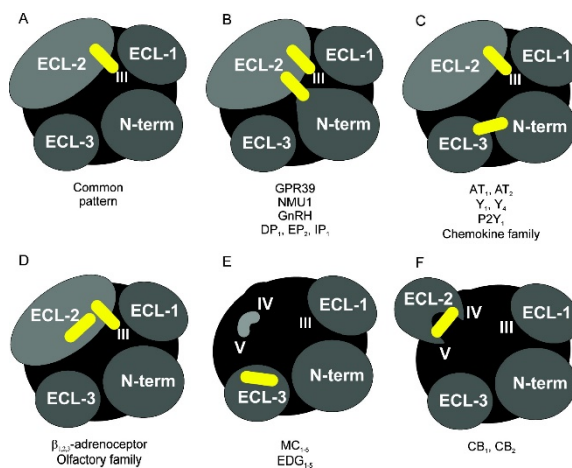


Figura 64. Patrones de formación de puentes disulfuro extracelulares (coloración amarilla) en la familia A de GPCRs. Imagen reproducida de Storjohann y colaboradores (2008). Copyright 2006 American Chemical Society.

La importancia de la diversidad observada en la formación de puentes disulfuro extracelulares en GPCRs deriva en diferencias en la farmacología de distintos ligandos. Esto nos llevó a plantear la hipótesis de que los puentes disulfuro extracelulares presentes en el receptor 5-HT_{2A} humano podrían condicionar su farmacología. Para validar esta hipótesis empleamos dos aproximaciones: la reducción inespecífica de puentes disulfuro extracelulares con el agente reductor DTT, y la mutación de las cisteínas que forman parte del puente disulfuro C148^{3.25}-C227^{ECL-2} en alaninas.

La reducción inespecífica de los puentes disulfuro extracelulares del receptor 5-HT_{2A} se llevó a cabo con un tratamiento con DTT 20 mM durante 10 min a 37 °C (**figura 65**), en células CHO-K1 5-HT_{2A}, una herramienta farmacológica optimizada previamente para la caracterización de los puentes disulfuro extracelulares en el receptor 5-HT_{2A} (150). Así, Iglesias y colaboradores estudiaron el efecto de la reducción inespecífica de puentes disulfuro extracelulares en la unión de [³H]LSD al receptor 5-HT_{2A}, y posterior señalización intracelular al medir la activación de PLC y PLA₂.

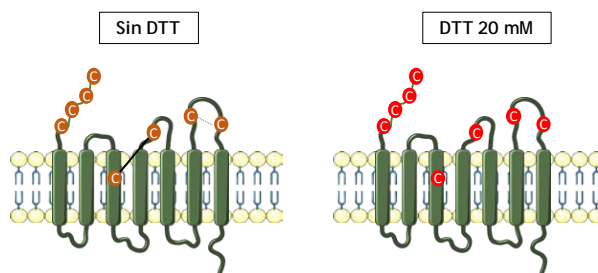


Figura 65. Representación del receptor 5-HT_{2A} en ausencia (sin DTT) y presencia de DTT 20 mM. De color naranja, las cisteínas extracelulares en estado nativo; de color rojo, las cisteínas extracelulares no reactivas, con los grupos tiol reducidos.

El LSD es un ligando agonista de receptores serotoninérgicos y, como tal, se une al receptor 5-HT_{2A} para estabilizar conformaciones activas de dicho receptor. La rotura inespecífica de puentes disulfuro extracelulares con DTT indujo un descenso del 22,60 % en la unión específica del [³H]LSD al receptor 5-HT_{2A}, sin alterar su constante de disociación en el equilibrio ni sus constantes cinéticas k_{on} y k_{off} (150).

Teniendo en cuenta que el modo de unión de un agonista a su receptor es distinto que el de un antagonista, y que cada ligando puede estabilizar diferentes conformaciones del receptor, el efecto de la reducción de los puentes disulfuro extracelulares podría variar en función de la naturaleza del ligando empleado. Por este motivo, en la presente tesis doctoral nos planteamos el uso de [³H]Ketanserina, un antagonista de receptores 5-HT₂, para el estudio del efecto del DTT en las conformaciones activas e inactivas del receptor 5-HT_{2A}.

La rotura inespecífica de puentes disulfuro extracelulares con DTT indujo un descenso del 25 % en la unión específica de la [³H]Ketanserina al receptor 5-HT_{2A}, sin alterar su constante de disociación en el equilibrio. Esto sugiere que la disponibilidad de bolsillos de unión del receptor 5-HT_{2A} disminuye en condiciones reductoras, pero que la naturaleza del bolsillo de unión ortostérico permanece inalterada no solo para la unión de agonistas, sino también para la unión de antagonistas. Lo mismo sucede en el receptor de citoquinas CCR1, donde la rotura del puente disulfuro C^{3.25}-C^{ECL-2a} a través de la sustitución de las cisteínas por alaninas implica una

reducción de B_{\max} sin que la afinidad del agonista endógeno disminuya (152), pero a diferencia del tratamiento con DTT, el descenso en la B_{\max} se atribuye a la rotura específica de un puente disulfuro extracelular, de los dos que se forman (66).

Los estudios de saturación proporcionan la constante de disociación en el equilibrio de un radioligando por un receptor, sin tener en cuenta que la unión de ligandos es un proceso dinámico. Así, el LSD se une de manera pseudoirreversible al receptor 5-HT_{2A}, pues su tiempo medio de disociación se extiende a más de 70 min (168), en comparación con los 5,8 min de la ketanserina (169). Estas diferencias que existen entre ligandos hacen que la caracterización de las constantes cinéticas cobre especial relevancia en el desarrollo de nuevos fármacos (170–173).

Es por ello por lo que se evaluó el efecto del DTT en las constantes de asociación y disociación de [³H]Ketanserina. A pesar de que la unión específica de [³H]Ketanserina se reduce en un 8,23 % en presencia de DTT, las constantes cinéticas se mantienen inalteradas. El efecto observado con [³H]Ketanserina fue similar al observado con [³H]LSD en receptores 5-HT_{2A}. Esto refuerza la hipótesis de que la naturaleza del bolsillo de unión ortostérico del receptor 5-HT_{2A} no se altera en un ambiente reductor, pero sí disminuye el número de bolsillos de unión disponibles.

Para completar el estudio del bolsillo de unión ortostérico en condiciones reductoras, nos planteamos el estudio de la constante de afinidad de ligandos de distinta naturaleza: agonistas y antagonistas. En otros GPCRs, la reducción inespecífica de la región extracelular deriva en la alteración de la afinidad de diversos ligandos por su receptor. Por ejemplo, se ha descrito que el tratamiento con DTT del receptor AT₂ potencia la unión tanto de agonistas como de antagonistas (174). Para el receptor de histamina 1 (H₁), el pretratamiento del homogeneizado de membrana de células expresando el receptor H₁ con DTT 100 μ M incrementa la unión de agonistas 10 veces con respecto al homogeneizado no tratado (175).

Para el receptor CB₁, el tratamiento con DTT aumenta la unión de antagonistas y disminuye la unión de agonistas (176).

En cuanto al receptor 5-HT_{2A}, el tratamiento con DTT no alteró la constante de afinidad de los ligandos agonistas serotonina y LSD. En cambio, sí modificó el perfil de competición de (±)DOI: en ausencia de pretratamiento con DTT, la curva de competición frente a [³H]Ketanserina se ajusta a dos fases, mientras que en condiciones reductoras, la curva de competición es monofásica, con una afinidad comparable a la fase de baja afinidad obtenida en ausencia de DTT. Este efecto se describió previamente en el receptor 5-HT_{1A}, donde el pretratamiento con DTT disminuyó la unión específica del radioligando [³H]8-OH-DPAT al receptor, cambiando el perfil bifásico a perfil monofásico (177).

Una característica de los ligandos agonistas es que se unen preferencialmente a las conformaciones activas del receptor, mientras que un ligando antagonista neutro se une a las conformaciones activas e inactivas por igual. Es por ello por lo que la competición de un ligando agonista frente a un radioligando antagonista puede resultar en una curva de competición de dos fases: una fase de alta afinidad, característica de la unión a proteína G, y una fase de baja afinidad (128). Los resultados obtenidos con (±)DOI sugieren que la reducción inespecífica de los puentes disulfuro extracelulares del receptor 5-HT_{2A} con DTT conlleva un cambio conformacional que dificulta el acoplamiento del receptor a la proteína G cuando se une (±)DOI a dicho receptor.

Estos estudios reafirman la importancia de la región extracelular en la activación de GPCRs, y el papel clave que juegan los puentes disulfuro extracelulares en el reconocimiento de ligandos. Para el (±)DOI se produce un cambio conformacional que no se detecta con los otros agonistas empleados, serotonina y LSD. Estos últimos compuestos son ligandos agonistas que compiten con radioligandos antagonistas, por lo que cabría esperar la obtención de curvas de competición bifásicas para todos ellos. En nuestro sistema no podemos apreciar la fase de alta afinidad de la serotonina y el LSD,

probablemente debido a que la fracción de receptor acoplado a proteína G sea baja. La serotonina es un agonista no alucinógeno, al contrario que (\pm)DOI y LSD, que sí lo son, con lo que las conformaciones que estabilizan podrían diferir. En cuanto a las diferencias observadas entre (\pm)DOI y LSD, el tamaño del LSD es mayor, uniéndose a la parte extracelular de los receptores serotoninérgicos en mayor extensión que las moléculas pequeñas (64), lo que sugiere que las conformaciones activas del receptor 5-HT_{2A} estabilizadas por cada uno de los agonistas son distintas.

Estos resultados confirman que el receptor 5-HT_{2A} puede estabilizarse en múltiples conformaciones, incluso dependiendo del agonista empleado, como previamente mostraron estudios funcionales, en los que la eficacia producida por distintos agonistas en el receptor 5-HT_{2A} depende de la vía de señalización evaluada (45,127,134,178–180). La estabilización de diferentes estados conformacionales se refleja, también, en la capacidad de distintos antagonistas de bloquear dicho receptor (128,129). Es necesario, por tanto, el estudio del efecto de la rotura de puentes disulfuro extracelulares del receptor 5-HT_{2A} en presencia de ligandos de distinta naturaleza.

Se estudió la afinidad de los ligandos antagonistas clozapina, haloperidol, ketanserina y metisergida en condiciones reductoras. Los estudios de competición frente al radioligando [³H]Ketanserina demostraron que la afinidad de estos antagonistas permanece inalterada en presencia del tratamiento con DTT 20 mM, si bien se observa un descenso en la unión específica de [³H]Ketanserina. Esto sugiere que la ausencia de puentes disulfuro extracelulares no condiciona la afinidad ligandos antagonistas por el receptor 5-HT_{2A}.

De esta forma, los estudios de unión de radioligandos sugieren que la rotura de puentes disulfuro extracelulares altera la conformación nativa del receptor 5-HT_{2A}. Si asumimos que (a) los agonistas se unen a conformaciones activas del receptor, y (b) los antagonistas se unen a conformaciones activas e inactivas del receptor, y dado que (c) se observó un descenso en la unión específica del 25 % tanto con el radioligando agonista [³H]LSD como con el radioligando

antagonista [^3H]Ketanserina, podemos asumir que este descenso se debe a una pérdida de conformaciones activas del receptor.

La participación de puentes disulfuro en la estabilización de conformaciones activas del receptor 5-HT $_2\text{A}$ concuerdan con los estudios de Zhang y colaboradores, que proponen que el establecimiento de puentes disulfuro extracelulares en GPCRs condicionan su activación: en ausencia del puente disulfuro C $^{3.25}$ -C $^{\text{ECL-2}}$ se favorecen la estabilización de conformaciones inactivas, mientras que el enlace C $^{3.25}$ -C $^{\text{ECL-2}}$ favorece la estabilización de conformaciones activas (**figura 66**) (149). Además, se ha demostrado que para el receptor 5-HT $_2\text{A}$, el ECL-2 es la región extracelular más dinámica en la activación de dicho receptor (148), con lo que cabría esperar que el puente disulfuro C $^{3.25}$ -C $^{\text{ECL-2}}$ tuviese especial relevancia en la activación de este receptor.

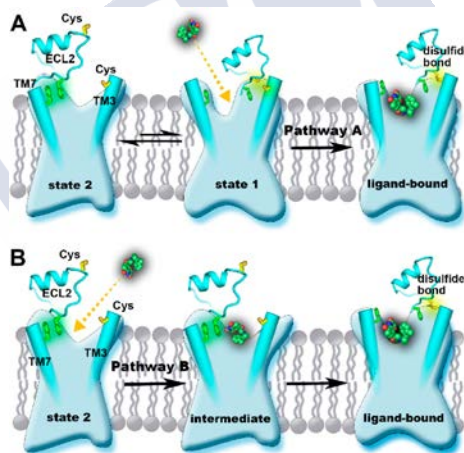


Figura 66. Esquema de unión de ligandos en GPCRs, donde se asume que, en ausencia de ligando, el puente disulfuro C $^{3.25}$ -C $^{\text{ECL-2}}$ no está formado, y el estado activo requiere de la formación del puente disulfuro. (A) Vía A de activación (*Pathway A*), según la cual la formación del puente disulfuro C $^{3.25}$ -C $^{\text{ECL-2}}$ precede la unión del ligando. (B) Vía B de activación (*Pathway B*), según la cual la unión del ligando es el detonante de la formación del puente disulfuro. Imagen reproducida de (149). Copyright 2018 American Chemical Society.

A la vista de nuestros resultados, la rotura inespecífica de puentes disulfuro con DTT disminuiría la población de receptores en estado

activo. Como consecuencia, la señalización intracelular podría estar modificada. Esto ya se ha visto en otros GPCRs, como el receptor A_{2A}, donde la mutación C^{ECL-2}S retiene la afinidad por ligandos, pero la señalización intracelular mediada por AMPc está alterada. Lo mismo sucede al hacer un tratamiento con DTT 10 mM durante 2 h a 37 °C (181).

En particular, la activación del receptor 5-HT_{2A} deriva en la acumulación de IPs por la activación de PLC. Estos IPs se unen a receptores del retículo endoplasmático ligados a canales de calcio, liberando calcio al citosol celular (105). Valorar el efecto del DTT en la medida de acumulación de IPs y en la medida de movilización de calcio permite evaluar la respuesta intracelular a dos niveles y, por ende, caracterizar la respuesta intracelular mediada por G_q en condiciones reductoras (164).

Al medir la acumulación de IPs producida por el receptor 5-HT_{2A}, se observó una disminución del 27,29 % y del 31,38 % en la respuesta total de serotonina y LSD, respectivamente, al tratar con DTT, sin alterar sus potencias. Esta reducción en la eficacia y no en la potencia concuerda con los resultados de unión de radioligandos: el descenso en la unión se traduce en un descenso en la función. Con respecto al agonista (±)DOI, el tratamiento con DTT redujo la respuesta máxima del agonista en un 39 %, y tampoco alteró su potencia. El acoplamiento a proteína G desfavorecido por el tratamiento con DTT se traduce en un descenso en la señal mediada por (±)DOI.

Cuando estudiamos el comportamiento de los ligandos antagonistas, la presencia de DTT tampoco alteró la potencia de clozapina y haloperidol al medir la acumulación de IPs. Por tanto, la ruptura inespecífica de los puentes disulfuro de la cara extracelular del receptor 5-HT_{2A} conlleva una disminución de la eficacia de los agonistas 5-HT, (±)DOI y LSD, que se explica por la pérdida de unión específica del receptor provocado por el tratamiento con DTT.

Para evaluar el efecto del tratamiento con DTT en la movilización de calcio mediado por el receptor 5-HT_{2A}, se puso a punto una metodología para su cuantificación. Para ello se optimizaron las

condiciones del ensayo en células CHO-K1 5-HT_{2A}, utilizando un lector FLIPR (162). A la hora de evaluar respuestas a calcio, se ha descrito que la presencia de FBS en el medio de ensayo puede alterar la respuesta de calcio obtenida en células CHO-K1 (182). Además, este tipo celular expresa bombas de extrusión de calcio, que de no ser bloqueadas con probenecid, dificultan la medida de una respuesta (183).

Se construyeron curvas concentración-respuesta de los agonistas serotonina, (±)DOI y LSD en presencia de FBS y probenecid, obteniéndose potencias y eficacias comparables a las descritas en la bibliografía (164). Al valorar el efecto de una concentración alta de serotonina en estas células, en comparación con células CHO-K1 que no expresan el receptor 5-HT_{2A}, se demostró que la serotonina moviliza calcio a través de este receptor. Se observó que la actividad basal de las células expresando el receptor es mayor que la de las células CHO-K1, lo que sugiere que la presencia del receptor 5-HT_{2A} podría incrementar los niveles basales de calcio.

Mientras que la medida de acumulación de IPs es una medida de respuesta en el equilibrio, que se prolonga a lo largo del tiempo, la medida de movilización de calcio sucede entre 10 y 20 segundos después de la adición del agonista, por lo que la medida de la respuesta de antagonistas a través de la movilización de calcio requiere de la preincubación del antagonista con el receptor, como se ha descrito previamente para los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} (165). Por tanto, se compararon distintos tiempos de preincubación de los antagonistas clozapina, haloperidol, espiperona y ritanserina, que oscilaron entre 2 y 20 min, frente a la acción de serotonina (control) y la actividad basal. Se observó que la preincubación de 2 min con los antagonistas clozapina, haloperidol y espiperona son suficientes para producir un 50 % de inhibición de respuesta a serotonina, sugiriendo que son antagonistas competitivos de acción rápida, y por ello, en poco tiempo se acomodan en el bolsillo de unión ortostérico.

Sin embargo, la inhibición con ritanserina resultó ser dependiente del tiempo. Así, se observó que 7 min de preincubación producen un

7 % de inactivación, mientras que a los 20 min de preincubación, la inhibición del receptor 5-HT_{2A} es total. Estos resultados concuerdan con el hecho de que la ritanserina es un antagonista pseudoirreversible que se asocia y disocia lentamente del receptor 5-HT_{2A} (54,184).

El ensayo de movilización de calcio para moléculas antagonistas se validó al construir curvas concentración-respuesta de los antagonistas clozapina, haloperidol y espiperona, en presencia de serotonina 0,1 μ M, obteniéndose potencias similares a las descritas en la bibliografía (120,165).

Una vez optimizado el ensayo de movilización de calcio, se valoró el efecto del tratamiento con DTT en esta vía de señalización. Al igual que al medir la acumulación de IPs, se comprobó que ninguno de los agonistas modifica su potencia tras el tratamiento con DTT, observándose una reducción en la eficacia del 41,30 %, 43,42 % y 71,76 % para serotonina, (\pm)DOI y LSD, respectivamente. De esta forma, el descenso en la eficacia de 5-HT y (\pm)DOI es el mismo que al medir la acumulación de IPs, pero el descenso en la eficacia del LSD es mayor.

Como se expuso previamente, el LSD es una molécula grande, a diferencia de los agonistas serotonina y (\pm)DOI. En el receptor 5-HT_{2B} se ha descrito que el LSD se une con una cinética de disociación lenta y, haciendo contactos con los extremos extracelulares de este receptor (64). En el receptor 5-HT_{2A}, el LSD tiene un tiempo medio de asociación de 14 min (150), a diferencia de compuestos más pequeños como la ketanserina, con un tiempo medio de asociación al receptor de 0,93 min.

A pesar de que el tratamiento con DTT no modificó la cinética de asociación ni de disociación de la [³H]Ketanserina o del [³H]LSD, se debe tener en cuenta que, como ya se mencionó previamente, la respuesta de un agonista en movilización de calcio aparece rápidamente, por lo tanto, el gran descenso en la función medida en la movilización de calcio podría deberse a que la reducción inespecífica de los puentes disulfuro extracelulares del receptor 5-HT_{2A} dificultaría la acomodación de moléculas de mayor peso molecular.

El LSD se ha utilizado en estudios de dinámica molecular para estudiar el efecto de la rotura del puente disulfuro $C^{3.25}-C^{ECL-2}$ en el receptor 5-HT_{2A}, empleando el receptor 5-HT_{2B} como modelo (150). La rotura de este anclaje deriva en la liberación de ECL-2 y TM-3 y, como consecuencia, ECL-2 tiene libertad de movimiento, llegando a introducirse dentro del bolsillo de unión ortostérico. Esto produce un colapso del bolsillo de unión, que impide la correcta acomodación de LSD (**figura 67**). Este colapso podría impedir también la unión de ligandos agonistas más pequeños, como son la serotonina o el (±)DOI, pero en menor extensión.

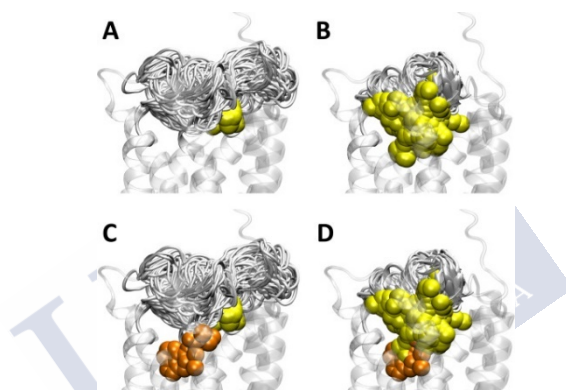


Figura 67. Análisis conformacional de ECL-2. La libertad conformacional de ECL-2 fue evaluada antes (A y D) y después (B y D) de la rotura del puente disulfuro $C^{148^{3.25}}-C^{227^{ECL-2}}$, en ausencia (A y B), y presencia (C y D) de LSD. Las esferas amarillas representan las posibles posiciones de las cisteínas; las esferas naranjas, el LSD. Imagen obtenida de Iglesias, Cimadevila, la Fuente, *et al.*, 2017, con permiso de Elsevier.

Al valorar el efecto del DTT en el comportamiento de ligandos antagonistas, el porcentaje de disminución de respuesta máxima del agonista es mayor del 50 %, superior a la detectada en ensayos de medida directa de respuesta agonista. La razón de esta pérdida de eficacia radica en el efecto dependiente del tiempo del DTT. En otros GPCRs, como en receptores cannabinoides (185) o en los receptores de angiotensina (174) se evidenció que el efecto reductor del DTT incrementaba con el tiempo. La preincubación con el antagonista incrementó el tiempo de contacto del receptor con el DTT, lo que

justifica que el descenso de la respuesta agonista en presencia de antagonistas sea más acusado que al medir la respuesta a agonistas solo.

Con respecto a la potencia de los antagonistas, esta se mantuvo inalterada para la clozapina y el haloperidol en presencia de serotonina y (\pm)DOI. Sin embargo, la inhibición de la movilización de calcio por clozapina en presencia de LSD se ajusta a una curva de dos fases, curva característica de dímeros que presentan cooperatividad entre protómeros, mientras que el tratamiento con DTT la reduce a una fase, lo que sugiere que la reducción inespecífica de los puentes disulfuro extracelulares altera la conformación adoptada por los dos protómeros del homodímero 5-HT_{2A}, dificultando la comunicación entre ellos.

Una característica de GPCRs que existen en forma dimérica es la cooperatividad o *crosstalk*, que se refiere a la comunicación cruzada entre ambos protómeros del dímero. En el receptor 5-HT_{2A} se ha descrito la existencia de cooperatividad negativa, en la que la unión de un ligando a uno de los protómeros del dímero condiciona la unión de un segundo ligando, y esto se refleja en la aparición de curvas bifásicas a la hora de medir una respuesta intracelular (101,129).

Esta cooperatividad se ve reflejada en la curva de inhibición bifásica de movilización de calcio de clozapina en presencia de LSD, para la que se obtienen una potencia alta de 0,09 nM y una potencia baja de 184 nM. La cooperatividad entre protómeros desaparece con el tratamiento de DTT, y se obtiene una potencia para clozapina de 1,09 nM. Podría suceder que el tratamiento con DTT provocase la rotura del homodímero, y que por ello desaparezca la cooperatividad entre ambos protómeros, si bien el receptor 5-HT_{2A} homodimérico es la mínima unidad funcional (101), con lo cual la ruptura del dímero implicaría la desaparición de una respuesta intracelular en respuesta a agonistas, con lo que asumimos que la naturaleza homodimérica del receptor 5-HT_{2A} permanece inalterada en presencia de DTT.

Además, Iglesias y colaboradores estudiaron previamente la dimerización del receptor 5-HT_{2A} tras la reducción inespecífica de los puentes disulfuro extracelulares del receptor 5-HT_{2A} empleando

experimentos de BRET. Los parámetros de $BRET_{50}$ y $BRET_{max}$ obtenidos fueron idénticos en ausencia y presencia de DTT, lo que indica que la rotura inespecífica de puentes disulfuro extracelulares del receptor no altera la homodimerización del receptor (150).

En resumen, hemos comprobado que las conformaciones activas del receptor 5-HT_{2A} están alteradas en condiciones reductoras, así como la comunicación entre ambos protómeros del homodímero. Esto refuerza la hipótesis de que los puentes disulfuro extracelulares juegan un papel clave en la activación del receptor 5-HT_{2A}.

Al estudiar cuáles son los puentes disulfuro responsables de la alteración de la funcionalidad provocada por DTT en el receptor 5-HT_{2A}, existen 8 cisteínas expuestas a la cara extracelular y disponibles para el establecimiento de puentes disulfuro. La cristalización del receptor 5-HT_{2A} evidenció que existe un puente disulfuro formado en la región extracelular, el conservado entre GPCRs, formado entre C148^{3.25} y C227^{ECL-2} (121). Además, existe la posibilidad de que se forme un puente disulfuro intra-hélice ECL-3, entre las cisteínas C349^{ECL-3}-C353^{ECL-3} (147,148).

Para determinar la relevancia del puente disulfuro conservado entre GPCRs en la funcionalidad del receptor 5-HT_{2A}, se generaron tres construcciones mutadas, en las que las cisteínas C148^{3.25}-C227^{ECL-2} implicadas en la formación de este puente disulfuro se mutaron a alaninas: dos mutantes simples, en los que una de las dos cisteínas que participan en el puente disulfuro queda libre, y por ello podría establecer puentes disulfuro compensatorios con otras cisteínas extracelulares (C148A y C227A, **figura 68**); y un mutante doble, en la que no se pueden establecer puentes disulfuro compensatorios (C148A/C227A, **figura 68**). Se eligió alanina como sustituto de la cisteína y no serina porque, a pesar de que la cadena aminoacídica de la serina mantiene el mismo tamaño y polaridad que la cisteína, el hidroxilo de la cadena lateral podría formar puentes de hidrógeno o salinos que compensasen la ausencia de dicho puente disulfuro. La alanina es un residuo más apolar, pero incapaz de establecer conexiones con otros residuos del receptor.

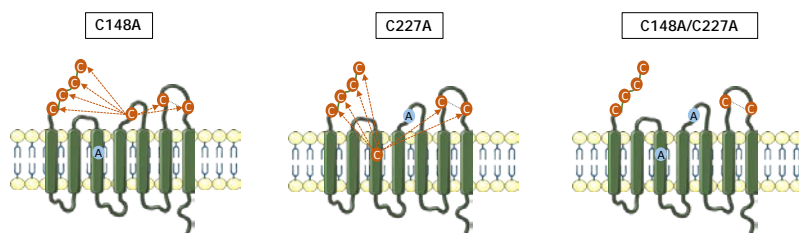


Figura 68. Representación del receptor 5-HT_{2A} expresando la mutación C148A, C227A y C148A/C227A. De color naranja, las cisteínas extracelulares; de color azul, la sustitución de la cisteína por alanina. Las flechas naranjas representan las posibilidades de interacción de las cisteínas libres con otras cisteínas extracelulares. Imagen realizada por la autora.

Una vez obtenidas estas construcciones se generaron cuatro líneas estables: una línea que expresa el receptor 5-HT_{2A} nativo WT; dos que expresan el receptor con la mutación simple C148A o C227A; y otra que expresa el receptor con la mutación doble, C148A/C227A. Las líneas generadas son células HEK293 inducibles, que tan solo expresan el receptor tras un tratamiento con doxiciclina a una concentración de 10 ng/ml durante 24 horas, siendo por tanto la línea en ausencia de doxiciclina un control de la especificidad del efecto observado. La correcta generación de las líneas se confirmó al visualizar la fluorescencia emitida por el receptor ligado a eYFP en un microscopio de alto contenido, tras su inducción con doxiciclina.

Con estas líneas se estudió el efecto del puente disulfuro C148^{3,25}-C227^{ECL-2} en la unión de ligandos de distinta naturaleza al receptor 5-HT_{2A}: del ligando antagonista [³H]Ketanserina, y del ligando agonista [³H]LSD. Dado que estudios previos de nuestro grupo de investigación demostraron la presencia del receptor 5-HT₇ en las células HEK293 (186), para la realización de estudios en los que el receptor 5-HT₇ puede interferir con las medida de unión y función del receptor 5-HT_{2A}, se empleó un bloqueante específico del receptor 5-HT₇, SB269970, a una concentración 1 μ M (187).

Al estudiar la unión de la [³H]Ketanserina en la fracción de membrana de células expresando el receptor WT, comprobamos que este se expresa correctamente, con una densidad de 92,98 fmol/mg de

proteína y una constante de disociación en el equilibrio de 0,38 nM, similar a la descrita en la bibliografía (166).

Sin embargo, la introducción de las mutaciones C148A, C227A y C148A/C227A en el receptor 5-HT_{2A} redujo la unión específica de [³H]Ketanserina a valores similares a la línea sin transfectar, ST. En otros GPCRs se ha descrito una pérdida de unión de antagonistas, como en el receptor adrenérgico 1 (β_1), en el que la B_{\max} del antagonista [³H]Prazosina se reduce al 11,3 % en el mutante C^{3.25}A y al 38,5 % en el mutante C^{ECL-2}A (188).

Al comparar el efecto del tratamiento con DTT con el efecto resultado de la rotura específica del puente disulfuro C148^{3.25}-C227^{ECL-2}, observamos que el descenso del 25 % registrado en el tratamiento con DTT se traduce en una incapacidad de unión del receptor mutado. El tratamiento con DTT podría no romper todos los puentes disulfuro extracelulares, dado que su efecto reductor es dependiente de la concentración y del tiempo (189). Por tanto, con la rotura inespecífica de puentes disulfuro extracelulares podría quedar una población de receptores a los que todavía les sea posible unir ligandos.

Otra posibilidad es que esta reducción inespecífica de la región extracelular del receptor 5-HT_{2A} sea completa, y que esto se traduzca en un aumento de la flexibilidad del receptor de forma que puede seguir acomodando ligandos, aunque en menor medida que en condiciones naturales. Lo que sí observamos son cambios conformacionales, inducidos por el aumento de la flexibilidad del receptor.

Una diferencia entre el tratamiento con DTT y las técnicas de mutagénesis es la localización del receptor. Mientras que en los tratamientos con DTT, el receptor migra a membrana en su estado nativo, y allí es donde es reducido, el receptor mutado debe migrar en ausencia del puente disulfuro C148^{3.25}-C227^{ECL-2} a membrana plasmática. Dado que estos estudios se hicieron en la preparación de membranas, las medidas están limitadas a la localización del receptor en membrana. Además, los estudios de unión en fracción de

membrana no permiten evaluar la unión en el entorno celular, que condiciona en muchos casos la unión de ligandos a GPCRs (161,190). Es por ello por lo que se valoró la unión de [3 H]Ketanserina en células vivas. A pesar de que al incrementar el número de células por pocillo se incrementa la unión específica de [3 H]Ketanserina a las células expresando el receptor WT, esta unión no se consideró suficiente para la realización de estudios de unión de [3 H]Ketanserina en las líneas mutadas.

Para evaluar el efecto de la ruptura del puente disulfuro C148^{3.25}-C227^{ECL-2} en la unión de agonistas, se empleó [3 H]LSD en fracción de membrana de células expresando el receptor nativo WT. Con 60 μ g de proteína por pocillo se obtuvo una densidad de 513 fmol/mg de proteína y una constante de disociación en el equilibrio de 0,78 nM, similar a la descrita en la bibliografía (150). Al contrastar la población de receptores marcada con [3 H]Ketanserina con la población de receptores marcada con [3 H]LSD, esta última resultó ser 5 veces superior, probablemente debido a las diferencias de expresión derivadas de distintos tratamientos con doxiciclina. La tecnología T-RExTM permite la generación de líneas celulares inducibles, pues en la célula se expresa una proteína represora de la transcripción del ADN. La extensión de la inhibición de esta proteína determina distintos niveles de expresión celular.

Al comparar la unión específica de [3 H]LSD al receptor 5-HT_{2A} nativo, con la unión específica de [3 H]LSD al receptor mutado C148A, C227A y C148A/C227A, se observó que la unión específica de [3 H]LSD al receptor mutado se redujo a niveles similares a los obtenidos en las líneas sin inducir y sin transfectar. La adición de SB269970 para bloquear el receptor 5-HT₇ redujo la unión específica de [3 H]LSD por igual en todas las líneas, demostrando que el [3 H]LSD se está uniendo a este receptor en las líneas generadas. Al incrementar la cantidad de proteína por pocillo no aumentó la unión específica del [3 H]LSD. Esto sugiere que, al igual que la [3 H]Ketanserina, el [3 H]LSD no es capaz de unirse al receptor mutado en la fracción de membrana. Por tanto, la unión de agonistas está impedida en ausencia del puente disulfuro C148^{3.25}-C227^{ECL-2}, como sucede en otros

GPCRs, como en el receptor AT₂, en el que las mutaciones C^{3.25}A y C^{ECL-2}A impiden totalmente la unión del agonista angiotensina II (174).

A diferencia de la [³H]Ketanserina, la unión específica de [³H]LSD en células vivas fue suficiente para estudiar la unión en células expresando el receptor mutado. Con 100000 células por pocillo, la unión de [³H]LSD fue 83,47 %, y la constante de afinidad de risperidona, 0,21 nM, similar a la descrita en la bibliografía (167).

En ausencia de SB269970, la unión específica de [³H]LSD en células vivas expresando el receptor mutado C148A, C227A y C148A/C227A se redujo en un 50 %, al compararlo con las células expresando el receptor WT. Al incubar simultáneamente la reacción con SB269970, la unión específica obtenida en las tres líneas expresando el receptor mutado fue similar a la línea sin transfectar, confirmando la unión de [³H]LSD al receptor 5-HT₇ endógeno, y que la unión de [³H]LSD en ausencia del puente disulfuro C148^{3.25}-C227^{ECL-2} está impedida. Así se deduce que la falta del puente disulfuro C148^{3.25}-C227^{ECL-2} deriva en un cambio conformacional del receptor que impide la unión tanto de agonistas como de antagonistas al bolsillo de unión ortostérico del receptor 5-HT_{2A}.

Los estudios de unión demuestran que el puente disulfuro C148^{3.25}-C227^{ECL-2} es imprescindible para la unión de ligandos al receptor 5-HT_{2A}. Sin embargo, la funcionalidad del mismo podría mantenerse en una pequeña población de receptores, en la que la unión no sea detectable con los ensayos de radioligandos. Esto sucede en numerosos GPCRs, como el receptor GPR39, donde se ha estudiado el efecto de las mutaciones C^{3.25}A, C^{ECL-2}A y C^{3.25}A/C^{ECL-2}A en el tráfico a membrana y funcionalidad de del receptor. Los mutantes muestran una unión de un 22, un 13 % y un 16 %, respectivamente, pero el receptor que alcanza la membrana plasmática es capaz de producir una respuesta intracelular (66). Lo mismo sucede con el receptor M₃, que reduce su localización en membrana un 20 % en ausencia del puente disulfuro C^{3.25}-C^{ECL-2}, pero

retiene su capacidad de activar proteínas G (191). Y es el caso del receptor del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), donde los mutantes se expresan un 60 % en membrana celular, pero son capaces de estimular la producción de AMPc intracelular (192). Con una pequeña población de receptores disponibles para unir ligandos bastaría, entonces, para obtener poder medir una respuesta intracelular.

Es por ello por lo que se valoró el efecto de las mutaciones C148A, C227A y C148A/C227A en la señalización intracelular del receptor 5-HT_{2A}, mediada por PLC. Con este objetivo, se validó la funcionalidad de la línea expresando el receptor WT como control en la medida de acumulación de IPs y movilización de calcio, y posteriormente, se valoró el efecto de las mutaciones en la señalización intracelular.

Para validar la línea expresando el receptor WT como control en la medida de acumulación de IPs, se estableció que 75000 células por pocillo es la densidad óptima para la realización de posteriores ensayos. Al añadir serotonina 10 μ M a células que expresan el receptor WT, se produce un incremento en la acumulación de IPs con respecto a la actividad basal, que no se observa en ausencia de receptor. De ello se deduce que la acumulación de IPs es inherente al receptor 5-HT_{2A} en nuestro sistema.

Los agonistas (\pm)DOI y LSD mostraron potencias y eficacias similares al medir la acumulación de IPs en la línea expresando el receptor WT que en la línea CHO-K1 5-HT_{2A}. Sin embargo, la potencia obtenida para la serotonina fue mayor que en células CHO-K1 5-HT_{2A}. Esto se atribuye a que las células CHO expresan de manera endógena el receptor 5-HT_{1B} (45), que al activarse por serotonina inhibe la adenilato ciclasa. Esto podría enmascarar la potencia real de la serotonina en el receptor 5-HT_{2A} expresado en células CHO-K1.

Para evitar interferencias de otros receptores, se estudió el efecto inhibitorio de la clozapina y el haloperidol en presencia de (\pm)DOI, un agonista selectivo del receptor 5-HT_{2A}, a una concentración 0,1 μ M.

Las potencias de ambos antagonistas resultaron ser de igual magnitud que las obtenidas en células CHO-K1 5-HT_{2A}.

Una vez validada la medida de la acumulación de IPs en la línea celular expresando el receptor WT, se ensayó una concentración fija de los agonistas 5-HT, (±)DOI y LSD, que produce un efecto máximo en la línea expresando el receptor WT, en las tres líneas expresando el receptor mutado. Se observó que ninguno de los ligandos agonistas produce una acumulación de IPs al estudiar el receptor conteniendo las mutaciones, de lo que se deduce que la rotura del puente disulfuro C148^{3,25}-C227^{ECL-2} impide la señalización intracelular al medir la acumulación de IPs.

Al revisar el efecto de la reducción inespecífica de los puentes disulfuro extracelulares, el tratamiento con DTT produjo una reducción de la eficacia de los agonistas 5-HT, (±)DOI y LSD, sin alterar sus potencias. La rotura de los puentes disulfuro extracelulares conlleva una pérdida de la funcionalidad del receptor 5-HT_{2A}, que se reduce a niveles inapreciables cuando la rotura del puente disulfuro C148^{3,25}-C227^{ECL-2} es total. Esto refuerza la idea de que las mutaciones impiden la unión de ligandos, dado que no se detecta una señal intracelular al medir acumulación de IPs.

Para comprobar que la desaparición de la respuesta intracelular mediada por PLC se mantiene a nivel de movilización de calcio, se llevaron a cabo medidas de movilización de calcio en receptores expresando las mutaciones C148A, C227A y C148A/C227A.

La densidad de 60000 células por pocillo resultó óptima para la realización de ensayos de movilización de calcio en células expresando el receptor WT. Al añadir serotonina 1 µM a células que no expresan el receptor, existe una movilización de calcio con respecto a la actividad basal. Esto puede ser debido a que la represión de la expresión del receptor 5-HT_{2A} no sea completa, y que exista una pequeña población de receptores que se exprese en ausencia de doxiciclina. Este efecto no es detectable al medir acumulación de IPs pero sí al medir la movilización de calcio, porque las medidas de movilización de calcio resultan de una amplificación de los IPs.

La potencia y la eficacia de los agonistas 5-HT, (\pm)DOI y LSD resultó ser de igual magnitud que la obtenida en células CHO-K1 5-HT_{2A}. La presencia de SB269970 no alteró ni la eficacia ni la potencia de la serotonina en la línea expresando el receptor WT. Al igual que en estudios de medida de acumulación de IPs, para evitar interferencias con otros receptores, se evaluó la potencia de los antagonistas clozapina y haloperidol en presencia de (\pm)DOI 0,1 μ M. Las constantes obtenidas fueron similares a las descritas en células CHO-K1 5-HT_{2A}.

Una vez validada la medida de la movilización de calcio en la línea celular expresando el receptor WT, se ensayó una concentración fija de los agonistas 5-HT, (\pm)DOI y LSD, que produjo un efecto máximo en la línea expresando el receptor WT, en las tres líneas expresando el receptor mutado. Se observó que ninguno de los ligandos agonistas produce una movilización de calcio al estudiar el receptor conteniendo las mutaciones, de lo que se deduce que la rotura del puente disulfuro C148^{3,25}-C227^{ECL-2} impide la señalización intracelular al medir la movilización de calcio.

Los resultados obtenidos de ensayos funcionales indican que el puente disulfuro C148^{3,25}-C227^{ECL-2} es imprescindible en la unión de ligandos al receptor 5-HT_{2A}, y una posible unión residual quedaría descartada al no producirse una respuesta intracelular amplificada. Los estudios con DTT ya indicaron la importancia de los puentes disulfuro extracelulares en la activación del receptor 5-HT_{2A}, pero la reducción sucede solo en la población de receptores que alcanzan la membrana plasmática. Al generar las construcciones mutadas, estos receptores son incapaces de mantener este puente disulfuro desde su síntesis, con lo que la generación de proteínas aberrantes podría condicionar su tráfico a membrana celular. En particular, al mutar las dos cisteínas implicadas en este puente disulfuro se alteran dos regiones clave implicadas en la activación de GPCRs: TM-3 y ECL-2.

Por un lado, TM-3 juega un papel importante en la dinámica de activación del receptor 5-HT_{2A}: la rotura del cierre iónico entre TM-3

y TM-6 permite la rotación de TM-6 que desencadena la activación del receptor 5-HT_{2A} (118).

Por otro lado, el ECL-2 surge como un punto de modulación de la respuesta intracelular. En otros GPCRs, la mutación de los residuos aminoacídicos pertenecientes a ECL-2 del receptor A₁ y el estudio individualizado de cada uno de los nuevos constructos conteniendo una de las mutaciones permitió determinar la implicación de cada uno de estos residuos en unión y función del receptor, demostrando la importancia de este dominio en su funcionalidad (193). Asimismo, el efecto de cada uno de los agonistas es dependiente del residuo mutado, como evidenció la mutación seriada de los residuos de ECL-2 pertenecientes al receptor del péptido relacionado con el gen del receptor CGRP (192), o modular la respuesta de agonistas sesgados, como se demostró para el receptor GLP-1 (51). Incluso se ha propuesto este bucle como un punto de modulación alostérica del receptor β_1 (151).

Por todo esto, cabría esperar que al alterar la secuencia aminoacídica del receptor 5-HT_{2A} en puntos críticos se modificase el ciclo natural del receptor dentro de la célula. Para otros GPCRs, la mutación de residuos clave puede implicar una migración truncada a membrana debido a un plegamiento erróneo de la proteína.

En general, la mutación de cisteínas extracelulares dificulta el tráfico a membrana de GPCRs. Por ejemplo, la doble mutación C^{N-term}A/C^{7.25}A en el receptor plaquetario P2Y₁₂ o C^{ECL-2}A/C^{ECL-2}A en el receptor adrenérgico 1 (β_1) impiden la expresión de dichos receptores en membrana celular (149).

En particular, la mutación a alanina de las cisteínas C^{3.25}A y C^{ECL-2}A impide que el receptor A₁ llegue a membrana plasmática (153); para los receptores CCR1 y CCR5, la localización en membrana se reduce en un 85 % al mutar estas cisteínas (152). Las mutaciones de C^{3.25}A, C^{ECL-2}A y la doble mutación reducen la expresión de GPR39 a un 22 %, un 13 % y un 16 %, respectivamente (66).

Sin embargo, el efecto no es igual en todos los GPCRs. La eliminación de dicho puente disulfuro en el receptor GnRH no altera la localización del receptor en membrana (194). Y aunque esté alterada, existen estudios que demuestran que, aunque el tráfico de un GPCR a membrana esté truncado, si hay una pequeña población capaz de alcanzarla, esta puede retener la capacidad de unir ligandos y producir una respuesta (66,181,191).

En el caso de que receptor 5-HT_{2A} no migre correctamente a la membrana celular se explicaría la falta de unión y función observada con las construcciones mutadas. Por ello, estudiamos la posibilidad de que la presencia de las mutaciones C148A, C227A y C148A/C227A alterase la localización del receptor 5-HT_{2A}. Así, se cuantificó la presencia del receptor en toda la célula y en membrana a través de la señal fluorescente emitida por la molécula de eYFP ligada al extremo carboxilo terminal del receptor WT y de los receptores mutados.

Se consideró el 100 % de intensidad de fluorescencia total, como la intensidad fluorescente obtenida en las células expresando el receptor WT, tras la inducción durante 24 h con doxiciclina 10 ng/ml. Al comparar la expresión del receptor WT con la expresión del receptor expresando las mutaciones, observamos que el doble mutante se expresa de manera similar a WT, mientras que la mutación C148A produjo un pequeño aumento en expresión total del receptor en la célula, y la mutación C227A produjo un descenso en la expresión del receptor de casi un 50 %. Esto sugiere que los dos mutantes simples, que tienen una de las cisteínas implicadas en el puente disulfuro C148^{3.25}-C227^{ECL-2} libre, podrían estar interaccionando con otras cisteínas extracelulares, para establecer puentes disulfuro compensatorios pero aberrantes, y que esta sea la causa de que la expresión sea variable. Esto se demuestra a través del estudio del doble mutante, que se mantiene arreactivo y, por lo tanto, se expresa de manera similar al receptor WT (figura 67).

Para estudiar la localización en la membrana celular del receptor 5-HT_{2A} mutado, se consideró la intensidad en membrana del receptor WT como el 100 %. La localización en membrana de los receptores

mutados C148A, C227A y C148A/C227A se redujo en más de un 50 %. Esto demuestra que las mutaciones dificultan el tráfico del receptor a membrana en la misma extensión, pero no lo impiden.

De esta forma, el puente disulfuro C148^{3,25}-C227^{ECL-2} condiciona el tráfico a membrana celular del receptor 5-HT_{2A}, y posiblemente su degradación. El primer punto de control del mal plegamiento de proteínas y marcaje para degradación en la célula es el retículo endoplasmático. Una de las causas de este mal plegamiento puede ser la formación de puentes disulfuro aberrantes inter- o intra-proteínas, así como la reducción de estos. En muchos casos, la formación de puentes disulfuro se requiere para la correcta maduración de la proteína (195), y posteriormente las oxidoreductasas, enzimas que catalizan la oxidación y reducción de los residuos tiol, restauran su forma nativa (196).

La mutación de residuos conservados en GPCRs implica, en muchos casos, su profunda alteración. La probabilidad de que el retículo endoplasmático identifique estas proteínas modificadas como erróneas es alta. Por ejemplo, la simple mutación del residuo conservado W^{4,50} en alanina del receptor de la hormona folículo estimulante FSH implica su completa retención en el retículo (197). Aplicado al receptor 5-HT_{2A}, la población de receptores que no alcanza la membrana plasmática podría quedarse retenida en el retículo endoplasmático.

Para el estudio de la retención del receptor mutado en el retículo endoplasmático, se midió la localización del receptor en retículo del receptor 5-HT_{2A} WT y mutado. La medida de la intensidad de fluorescencia en el retículo endoplasmático del receptor 5-HT_{2A} expresando las mutaciones C148A, C227A y C148A/C227A no supuso una alteración en la localización del receptor en el retículo endoplasmático, al compararlo con el receptor WT. Así, el tráfico truncado a membrana del receptor mutado no se debe a una retención del receptor en retículo, si no a que el receptor se encuentra en otras rutas de degradación, como podría ser en lisosomas.

Esto concuerda con estudios en otros GPCRs, en los que la eliminación del puente disulfuro $C^{3.25}-C^{ECL-2}$ no supuso un incremento en la retención del receptor en el retículo, como para el receptor A_{2A} , en el que se estudió el efecto en el tráfico a membrana de los tres mutantes, $C^{3.25}A$, $C^{ECL-2}A$ y $C^{3.25}A/C^{ECL-2}A$, utilizando colorantes de retículo. Naranjo y colaboradores demostraron que las mutaciones incrementaban la retención en el retículo del receptor A_{2A} , si bien los tres receptores mutados alcanzaban la membrana plasmática y eran capaces de unir ligandos con una afinidad similar que el receptor sin mutar (154).

A la vista de que la ausencia del puente disulfuro $C148^{3.25}-C227^{ECL-2}$ reduce la localización del receptor $5-HT_{2A}$ en membrana, pero no la impide, y que la población que alcanza la membrana plasmática es incapaz de unir ligandos y de producir una respuesta intracelular, decidimos evaluar si la ausencia del puente disulfuro $C148^{3.25}-C227^{ECL-2}$ podría condicionar su homodimerización.

En general, una interfaz dimérica que implique el establecimiento de puentes disulfuro es infrecuente en GPCRs de clase A. Se ha descrito que el puente disulfuro $C^{3.25}-C^{ECL-2}$ participa en la homodimerización del receptor M_3 de rata, posiblemente mediante un intercambio de puentes disulfuro monómero-dímero (198). Para el homodímero de receptores $5-HT_4$, la mutación de las cisteínas $C^{3.44}$ y $C^{4.49}$ en alaninas, supone una disminución de la población de homodímeros formados, lo que sugiere que ambas cisteínas participan en la formación del homodímero. Sin embargo, si se estudia el comportamiento de estas cisteínas en el heterodímero $5-HT_4-\beta_2$, estas no participan en la interacción entre receptores. Esto sugiere que el establecimiento de puentes disulfuro solo es necesario para la formación de homodímeros de este receptor (92).

Iglesias y colaboradores observaron que en la interfaz dimérica del receptor $5-HT_{2A}$ no participan puentes disulfuro (150), y aunque los estudios con DTT mostraron que la reducción inespecífica de puentes disulfuro extracelulares deriva en una pérdida de

cooperatividad del homodímero, este retiene su capacidad de producir una respuesta intracelular. No obstante, la reducción extracelular de puentes disulfuro altera la conformación del receptor 5-HT_{2A} y, en particular, la rotura del puente disulfuro C148^{3.25}-C227^{ECL-2} modifica la naturaleza de TM-3 y ECL-2. Una interfaz dimérica que implique ECL-2, como en el caso del homodímero A₁-A₁ (**figura 69**) podría suceder en el homodímero 5-HT_{2A}. La cristalización del receptor A₁ permitió la simulación de la interacción entre los dos protómeros del homodímero, describiéndose el ECL-2 como punto clave en la homodimerización, al establecerse contactos hidrofóbicos entre los dos bucles extracelulares de los dos protómeros del homodímero (199).

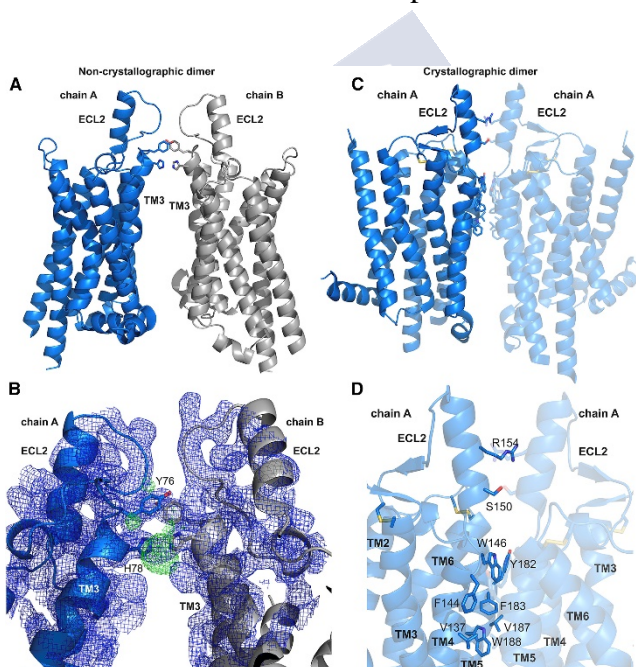


Figura 69. Contactos entre monómeros A₁. (A) y (B) Contactos establecidos entre las dos copias no cristalográficas en una misma unidad asimétrica. (C) y (D) Contactos cristalográficos que caracterizan los contactos hidrofóbicos entre los monómeros A₁-A₁ en orientación paralela. Imagen reproducida de Glukhova *et al.*, 2017 con permiso de Elsevier®.

Si en la interfaz dimérica del homodímero 5-HT_{2A}-5-HT_{2A} participa ECL-2 como en el homodímero A₁-A₁, la rotura del puente

disulfuro C148^{3.25}-C227^{ECL-2} condicionaría su homodimerización. Con el objeto de confirmar dimerización del receptor 5-HT_{2A} en presencia de las mutaciones C148A, C227A y C148A/C227A, se realizaron estudios de BRET y Western Blot.

Los experimentos de saturación de BRET permiten detectar la interacción entre dos proteínas a través una curva hiperbólica (200,201), de la que se extraen dos parámetros: el BRET_{max}, que guarda relación con la cantidad de ADN transfectado; y el BRET₅₀, que indica la afinidad de un protómero del dímero por el otro (197).

En los estudios de BRET realizados en el receptor 5-HT_{2A}, se confirmó que el BRET₅₀ obtenido en la línea expresando el receptor WT era similar al obtenido en la línea CHO-K1 5-HT_{2A} (150). Las parejas de receptor mutado C227A-C227A y C148A/C227A-C148A/C227A mantuvieron un BRET₅₀ idéntico al del receptor WT. Sin embargo, el BRET₅₀ de la pareja C148A-C148A resultó ser inferior al del receptor WT. Estos resultados sugieren que la mutación de estas cisteínas no compromete el estado oligomérico del receptor. Los cambios conformacionales inducidos en el receptor por la ruptura del puente disulfuro C148^{3.25}-C227^{ECL-2} no impide la formación de homodímeros, aunque sí la dificulta al mutar C148.

Con respecto al BRET_{max} obtenido, para las parejas de receptor mutado C227A-C227A y C148A/C227A-C148A/C227A este fue comparable al obtenido con la pareja WT-WT, mientras que la pareja C148A-C148A resultó en un BRET_{max} superior. Esto confirma que la mutación C148A es la que induce el mayor cambio de conformación que altera la interfaz dimérica, probablemente debido a que en esta construcción mutada la cisteína del ECL-2 queda libre de establecer puentes disulfuro aberrantes con otras cisteínas extracelulares.

Una diferencia apreciable entre las hipérbolas de saturación de BRET obtenidas fue que, para las parejas C227A-C227A y C148A/C227A-C148A/C227A, la expresión total es menor que para la pareja WT-WT. Para estudiar la expresión del receptor mutado frente al receptor nativo en las transfecciones transitorias, se aumentó la cantidad de ADN por pocillo, de 100 µg a 150 µg. Mientras que el

BRET_{max} permaneció constante, la razón de emisiones eYFP/RLuc aumentó al transfectar 150 µg de ADN por pocillo con respecto a la transfección de 100 µg de ADN por pocillo. Sin embargo, las parejas C227A-C227A y doble mutante reflejan una expresión de receptor menor transfectando las mismas cantidades de ADN, siendo por tanto la mutación de la cisteína en ECL-2 la responsable del descenso de la expresión del receptor en la célula. La conformación adoptada por el receptor podría ser más aberrante, y por ello, degradarse en mayor medida.

Estos estudios confirman que en ausencia de puente disulfuro C148^{3.25}-C227^{ECL-2} existe una transferencia de energía entre protómeros, pero no permiten determinar el número de unidades de receptor 5-HT_{2A} que forman parte del oligómero.

Para confirmar la homodimerización del receptor 5-HT_{2A}, se lisaron células expresando el receptor WT, o los mutados, C148A, C227A y C148A/C227A y se evaluó la naturaleza monomérica, dimérica u oligomérica del receptor mediante técnicas de Western Blot, empleando un anticuerpo dirigido a la secuencia *myc* que precede al receptor 5-HT_{2A} en el extremo N-term. Se confirmó que ninguna de las mutaciones induce la ruptura del homodímero, al observarse una banda inmunorreactiva de aproximadamente 75 KDa y otra banda de 150 KDa que se corresponden al monómero y al homodímero, respectivamente, para las cuatro líneas celulares, WT, C148A, C227A y C148A/C227A. Como control negativo, en la línea ST no se detectan bandas inmunorreactivas, lo que confirma el marcaje específico del anticuerpo. Además, no se detectan bandas a mayor peso molecular, con lo que se demuestra que en la dimerización del receptor 5-HT_{2A} participan dos protómeros.

Confirmamos así que el puente disulfuro C148^{3.25}-C227^{ECL-2} no participa en la homodimerización del receptor 5-HT_{2A}, pero otras cisteínas extracelulares sí podrían participar en la interfaz dimérica. En los GPCRs de clase C, los bucles extracelulares sí parecen jugar un papel importante en su dimerización. Estos GPCRs se caracterizan por tener un extremo N-term más voluminoso que los GPCR de clase A,

que participa más activamente en el reconocimiento de ligandos e interfaz dimérica. Así, técnicas de Western Blot permitieron determinar que el homodímero mGlu5-mGlu5 se rompe con un tratamiento de DTT 20 mM a 60 °C durante 3 min (202); lo mismo sucede con el homodímero del receptor de calcio extracelular CaR (203).

Estudios en otros GPCRs de clase A demostraron que la adición de DTT al tampón de carga supone la ruptura del dímero. Para el receptor de bradicinina 2 (B2) coinmunoprecipitado, se observó que el tratamiento de 5 min a 100 °C con DTT 100 mM rompe el homodímero B2-B2 (204); para el receptor de tromboxano, el tratamiento del lisado celular con un tampón de carga suplementado con DTT 50 mM convierte el oligómero del receptor a su forma monomérica (205).

Con respecto a otros receptores de serotonina, como los 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D}, la adición de DTT al tampón de carga permite la visualización de dichos receptores en estado monomérico mediante técnicas de Western Blot (206); o el homodímero del receptor 5-HT₄, donde el DTT a una concentración 20 mM rompe el homodímero coinmunoprecipitado (92).

Sin embargo, el tratamiento de 10 min a 37 °C con DTT 20 mM de los lisados de células WT expresando el receptor 5-HT_{2A} no altera la naturaleza homodimérica del receptor, lo que refuerza la idea de que la interfaz dimérica del complejo 5-HT_{2A}-5-HT_{2A} no requiere de la presencia de ningún puente disulfuro.

En resumen, en la presente tesis doctoral se ha demostrado que el puente disulfuro formado entre las cisteínas C148^{3.25}-C227^{ECL-2} es crítico para que el receptor 5-HT_{2A} adopte una conformación adecuada para el reconocimiento de ligandos agonistas y antagonistas, sin alterar su naturaleza homodimérica. Este conocimiento abre la puerta al diseño de mejores moléculas implementables en la farmacología antipsicótica.



CONCLUSIONES/CONCLUSIONS



1. La reducción inespecífica de puentes disulfuro extracelulares disminuyó la población de conformaciones activas marcadas con [^3H]Ketanserina del receptor 5-HT $_{2A}$ nativo, sin alterar las constantes de afinidad de ligandos agonistas o antagonistas, a excepción de (\pm)DOI. Para este ligando, el tratamiento con DTT convirtió la curva de competición bifásica a monofásica.
Non-specific reduction of extracellular disulphide bridges decreased the [^3H]Ketanserin labelled population of 5-HT $_{2A}$ receptor active conformations, without affecting agonist and antagonist affinity constants, except for (\pm)DOI. For this ligand, DTT treatment transformed the biphasic competition curve in a monophasic competition curve.

2. La medida de la respuesta intracelular mediada por la PLC tras la reducción inespecífica de los puentes disulfuro extracelulares confirmó estos juegan un papel clave en la activación del receptor 5-HT $_{2A}$ nativo. El tratamiento con DTT indujo un descenso en la eficacia de ligandos agonistas, sin alterar sus potencias. Con respecto a los ligandos antagonistas, el DTT indujo un cambio conformacional que dificultó la cooperatividad entre los dos protómeros del homodímero cuando se valoró la movilización de calcio de LSD en presencia de clozapina.
Intracellular response measurements induced by PLC activation after the non-specific reduction of extracellular disulphide bridges confirmed that they play a key role in 5-HT $_{2A}$ receptor activation. DTT treatment induced a decrease in agonist efficacies, without affecting their potencies. Owing to antagonist ligands, DTT treatment induced a conformational change that impeded crosstalk among homodimer protomers when evaluating calcium mobilization of LSD in the presence of clozapine.

3. El empleo de técnicas de mutagénesis dirigida, junto con la tecnología Flp-In $^{\text{TM}}$ T-REx $^{\text{TM}}$ permitió el diseño de un modelo

experimental para el estudio de la influencia del puente disulfuro C148^{3,25}-C227^{ECL-2} en la farmacología del receptor 5-HT_{2A} humano.

The use of directed mutagenesis techniques, together with the Flp-InTM T-RExTM technologies, allowed the design of an experimental model to study the influence of C148^{3,25}-C227^{ECL-2} disulphide bridge in 5-HT_{2A} receptor pharmacology.

4. La sustitución de las cisteínas C148 y C227 por alaninas impidió la unión específica de [³H]Ketanserina a fracción de membrana de células expresando el receptor recombinante y de [³]LSD a fracción de membrana y célula entera expresando dicho receptor. El puente disulfuro C148^{3,25}-C227^{ECL-2} fue imprescindible para la unión de estos radioligandos al receptor 5-HT_{2A} mutado.

Substituting of cysteine C148 and cysteine C227 for alanines impeded the specific binding of [³H]Ketanserin to the membrane fraction of cells expressing the recombinant receptor, and specific binding of [³H]LSD to the membrane fraction and whole cells expressing the recombinant receptor. The C148^{3,25}-C227^{ECL-2} disulphide bridge was essential for these radioligands to bind 5-HT_{2A} mutated receptor.

5. La ausencia del puente disulfuro C148^{3,25}-C227^{ECL-2} anuló la aparición de una respuesta intracelular mediada por la PLC. Los agonistas 5-HT, (±)DOI y LSD no produjeron ni un aumento en la acumulación de IPs ni una movilización de calcio en células expresando el receptor mutado.

The absence of the C148^{3.25}-C227^{ECL-2} disulphide bridge dampened the PLC-mediated intracellular response. The agonists 5-HT, (±)DOI and LSD did not increase IPs accumulation nor calcium mobilization in cells expressing the mutated receptor.

6. El puente disulfuro C148^{3.25}-C227^{ECL-2} fue necesario para la correcta migración a la membrana celular del receptor 5-HT_{2A} humano. Solo el 50 % del receptor expresando las mutaciones C148A, C227A y C148A/C227A alcanzó la membrana plasmática. Sin embargo, estas mutaciones no incrementan su retención en el retículo endoplasmático.

The C148^{3.25}-C227^{ECL-2} disulphide bridge was necessary to cell membrane trafficking of 5-HT_{2A} receptor. Just 50 % of the receptor expressing the mutations C148A, C227A and C148A/C227A could reach cell membrane. However, these mutations did not increase its retention in the endoplasmic reticulum.

7. La ausencia del puente disulfuro C148^{3.25}-C227^{ECL-2} no comprometió la naturaleza homodimérica del receptor 5-HT_{2A} humano. La afinidad de un protómero del dímero por el otro se mantuvo inalterada en presencia de las mutaciones C227A y C148A/C227A, y fue más baja en el caso del receptor expresando la mutación C148A. La medida de la homodimerización con técnicas de Western Blot reveló que las tres construcciones mutadas existen en forma homodimérica.

The absence of the C148^{3.25}-C227^{ECL-2} disulphide bridge did not compromise the homodimeric nature of 5-HT_{2A} receptor. The affinity between protomers remained unaltered in the presence of the mutations C227A and C148A/C227A, but it was decreased in the C148A receptor. Homodimerization evaluation using Western Blot techniques revealed that the three mutated constructions existed as homodimers.





REFERENCIAS



1. Keshavan MS, Tandon R, Boutros NN, Nasrallah HA. Schizophrenia, «just the facts»: What we know in 2008. Part 3: Neurobiology. Vol. 106, Schizophrenia Research. 2008. p. 89-107.
2. Haddad PM, Correll CU. The acute efficacy of antipsychotics in schizophrenia: a review of recent meta-analyses. *Ther Adv Psychopharmacol*. 2018;8(11):303-18.
3. Khandaker GM. Inflammation and immunity in schizophrenia : implications for pathophysiology and treatment. *Lancet Psychiatry*. 2015;2(3):258-70.
4. Patel JK, Buckley PF, Woolson S, Hamer RM, McEvoy JP, Perkins DO, *et al*. Metabolic profiles of second-generation antipsychotics in early psychosis: Findings from the CAFE study. *Schizophr Res*. 2009;111(1-3):9-16.
5. Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC. Schizophrenia as a Complex Trait: Evidence from a Meta-analysis of Twin Studies. *Arch Gen Psychiatry*. 2003;60(12):1187-92.
6. Ripke S, Neale BM, Corvin A, Walters JTR, Farh KH, Holmans PA, *et al*. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*. 2014;511(7510):421-7.
7. Holloway T, González-Maeso J. Epigenetic Mechanisms of Serotonin Signaling. *ACS Chem Neurosci*. 2015;6(7):1099-109.
8. Niemelä S, Sourander A, Surcel HM, Hinkka-Yli-Salomäki S, McKeague IW, Cheslack-Postava K, *et al*. Prenatal nicotine exposure and risk of schizophrenia among offspring in a national birth cohort. *Am J Psychiatry*. 2016;173(8):799-806.
9. Brown AS, Derkits EJ. Prenatal infection and schizophrenia: A review of epidemiologic and translational studies. *Am J Psychiatry*. 2010;167(3):261-80.

10. Khandaker GM, Zimbron J, Lewis G, Jones PB. Prenatal maternal infection, neurodevelopment and adult schizophrenia: A systematic review of population-based studies. *Psychol Med.* 2013;43(2):239-57.
11. Fuxe K, Marcellino D, Woods AS, Giuseppina L, Antonelli T, Ferraro L, *et al.* Integrated signaling in heterodimers and receptor mosaics of different types of GPCRs of the forebrain: Relevance for schizophrenia. Vol. 116, *Journal of Neural Transmission.* Springer Vienna; 2009. p. 923-39.
12. Mocci G, Jiménez-Sánchez L, Adell A, Cortés R, Artigas F. Expression of 5-HT_{2A} receptors in prefrontal cortex pyramidal neurons projecting to nucleus accumbens. Potential relevance for atypical antipsychotic action. *Neuropharmacology.* 2014;79:49-58.
13. Stahl S. *Essential psychopharmacology. Neuroscientific basis and practical applications.* 3rd ed. New York: Cambridge University Press; 2008.
14. Schmidt CJ, Sorensen SM, Kehne JH, Carr AA, Palfreyman MG. The role of 5-HT_{2A} receptors in antipsychotic activity. *Life Sci.* 1995;56(25):2209-22.
15. Khandaker GM, Dantzer R. Is there a role for immune-to-brain communication in schizophrenia? *Psychopharmacology (Berl).* 2016;233(9):1559-73.
16. Watkins CC, Andrews SR. Clinical studies of neuroinflammatory mechanisms in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2015;176(1):14-22.
17. Meltzer HY. What's atypical about atypical antipsychotic drugs? Vol. 4, *Current Opinion in Pharmacology.* 2004. p. 53-7.
18. Leucht S, Corves C, Arbter D, Engel RR, Li C, Davis JM. Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. *Lancet.* 2009;373(9657):31-

- 41.
19. Alberdi Sudupe J, Castro Dono C. Esquizofrenia [Internet]. Fistera. 2013 [citado 6 de junio de 2014]. Disponible en: <https://www.fistera.com/guias-clinicas/esquizofrenia/>
 20. Kaar SJ, Natesan S, McCutcheon R, Howes OD. Antipsychotics: Mechanisms underlying clinical response and side-effects and novel treatment approaches based on pathophysiology. *Neuropharmacology*. 2019;107704.
 21. Horacek J, Bubenikova-Valesova V, Kopecek M, Pelenicek T, Dockery C, Mohr P, *et al.* Mechanism of Action of Atypical Antipsychotic Drugs and the Neurobiology of Schizophrenia. *CNS Drugs*. 2006;20(5):389-409.
 22. Meltzer HY, Matsubara S, Lee JC. Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D-1, D-2 and serotonin2pK(i) values. *J Pharmacol Exp Ther*. 1989;251(1):238-46.
 23. Kapur S, Zipursky RB, Remington G. Clinical and theoretical implications of 5-HT2 and D2 receptor occupancy of clozapine, risperidone, and olanzapine in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 1999;156(2):286-93.
 24. Westerink BH. Can antipsychotic drugs be classified by their effects on a particular group of dopamine neurons in the brain? *Eur J Pharmacol*. 2002;455(1):1-18.
 25. Sykes DA, Moore H, Stott L, Holliday N, Javitch JA, Robert Lane J, *et al.* Extrapyramidal side effects of antipsychotics are linked to their association kinetics at dopamine D 2 receptors. *Nat Commun*. 2017;8(1):763.
 26. Loryan I, Melander E, Svensson M, Payan M, König F, Jansson B, *et al.* In-depth neuropharmacokinetic analysis of antipsychotics based on a novel approach to estimate unbound target-site concentration in CNS regions: Link to spatial

- receptor occupancy. *Mol Psychiatry*. 2016;21(11):1527-36.
27. Pereira A, Sugiharto-Winarno A, Zhang B, Malcolm P, Fink G, Sundram S. Clozapine induction of ERK1/2 cell signalling via the EGF receptor in mouse prefrontal cortex and striatum is distinct from other antipsychotic drugs. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2012;15(8):1149-60.
 28. Fribourg M, Moreno JL, Holloway T, Provasi D, Baki L, Mahajan R, *et al*. Decoding the signaling of a GPCR heteromeric complex reveals a unifying mechanism of action of antipsychotic drugs. *Cell*. 2011;147(5):1011-23.
 29. Imming P, Sinning C, Meyer A. Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(10):821-34.
 30. Salon JA, Lodowski DT, Palczewski K. The significance of G protein-coupled receptor crystallography for drug discovery. *Pharmacol Rev*. 2011;63(4):901-37.
 31. Alexander SP, Davenport AP, Kelly E, Marrion N, Peters JA, Benson HE, *et al*. The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol*. 2015;172(24):5744-869.
 32. Pándy-Szekeres G, Munk C, Tsonkov TM, Mordalski S, Harpsøe K, Hauser AS, *et al*. GPCRdb in 2018: Adding GPCR structure models and ligands. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D440-6.
 33. Christopoulos A, Kenakin T. G protein-coupled receptor allostery and complexing. *Pharmacol Rev*. 2002;54(2):323-74.
 34. Vauquelin G, Bricca G, Van Liefde I. Avidity and positive allosteric modulation/cooperativity act hand in hand to increase the residence time of bivalent receptor ligands. *Fundam Clin Pharmacol*. 2013;28(5):530-43.

35. Rovira X, Trapero A, Pittolo S, Zussy C, Faucherre A, Jopling C, *et al.* OptoGluNAM4.1, a Photoswitchable Allosteric Antagonist for Real-Time Control of mGlu4 Receptor Activity. *Cell Chem Biol.* 2016;23(8):929-34.
36. García-Cárceles J, Decara JM, Vázquez-Villa H, Rodríguez R, Codesido E, Cruces J, *et al.* A Positive Allosteric Modulator of the Serotonin 5-HT_{2C} Receptor for Obesity. *J Med Chem.* 2017;60(23):9575-84.
37. Latek D, Modzelewska A, Trzaskowski B, Krzysztof P, Filipek S. G protein-coupled receptors — recent advances. *Acta Biochim Pol.* 2012;59(4):515-29.
38. Gondin AB, Halls ML, Canals M, Briddon SJ. GRK mediates μ -opioid receptor plasma membrane reorganization. *Front Mol Neurosci.* 2019;12:104.
39. Jacobson KA. New paradigms in GPCR drug discovery. *Biochem Pharmacol.* 2015;98(4):541-55.
40. Galaz-Montoya M, Wright SJ, Rodriguez GJ, Lichtarge O, Wensel TG. β ₂-Adrenergic receptor activation mobilizes intracellular calcium via a non-canonical cAMP-independent signaling pathway. *J Biol Chem.* 2017;292(24):9967-74.
41. Grundmann M, Merten N, Malfacini D, Inoue A, Preis P, Simon K, *et al.* Lack of beta-arrestin signaling in the absence of active G proteins. *Nat Commun.* 2018;9(1).
42. Samama P, Cotecchia S, Costa T, Lefkowitz RJ. A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem.* 1993;268(7):4625-36.
43. Kenakin T. Ligand-selective receptor conformations revisited: The promise and the problem. *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24(7):346-54.

44. Leff P. The two-state model of receptor activation. *Trends Pharmacol Sci.* 1995;16(3):89-97.
45. Berg KA, Maayani S, Clarke WP. Interactions between effectors linked to serotonin receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;861:111-20.
46. Unett DJ, Gatlin J, Anthony TL, Buzard DJ, Chang S, Chen C, *et al.* Kinetics of 5-HT_{2B} Receptor Signaling: Profound Agonist- Dependent Effects on Signaling Onset and Duration. *J Pharmacol Exp Ther.* 2013;347(3):645-59.
47. McCorvy JD, Wacker D, Wang S, Agegnehu B, Liu J, Lansu K, *et al.* Structural determinants of 5-HT_{2B} receptor activation and biased agonism. *Nat Struct Mol Biol.* 2018;25(9):787-96.
48. Klein Herenbrink C, Sykes DA, Donthamsetti P, Canals M, Coudrat T, Shonberg J, *et al.* The role of kinetic context in apparent biased agonism at GPCRs. *Nat Commun.* 2016;7:1-14.
49. Baltos JA, Paoletta S, Nguyen AT, Gregory KJ, Tosh DK, Christopoulos A, *et al.* Structure-activity analysis of biased agonism at the human adenosine A₃ receptor. *Mol Pharmacol.* 2016;90(1):12-22.
50. Liu JJ, Sharma K, Zangrandi L, Chen C, Humphrey SJ, Chiu YT, *et al.* In vivo brain GPCR signaling elucidated by phosphoproteomics. *Science.* 2018;360(6395):eaao4927.
51. Wootten D, Reynolds CA, Smith KJ, Mobarec JC, Koole C, Savage EE, *et al.* The extracellular surface of the GLP-1 receptor is a molecular trigger for biased agonism. *Cell.* 2016;165(7):1632-43.
52. Sengmany K, Singh J, Stewart GD, Conn PJ, Christopoulos A, Gregory KJ. Biased allosteric agonism and modulation of metabotropic glutamate receptor 5: Implications for optimizing preclinical neuroscience drug discovery. *Neuropharmacology.* 2017;115:60-72.

53. Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, *et al.* Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*. 2000;289(5480):739-45.
54. Leysen JE, Gommeren W, Van Gompel P, Wynants J, Janssen PF, Lauduron PM. Receptor-binding properties in vitro and in vivo of ritanserin: A very potent and long acting serotonin-5₂ antagonist. *Mol Pharmacol*. 1985;27(6):600-11.
55. Ballesteros JA, Weinstein H. Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods Neurosci*. 1995;25(C):366-428.
56. Wang CI, Lewis RJ. Emerging opportunities for allosteric modulation of G-protein coupled receptors. *Biochem Pharmacol*. 2013;85(2):153-62.
57. Venkatakrishnan A, Deupi X, Lebon G, Tate CG, Schertler GF, Babu MM. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2013;494(7436):185-94.
58. Peeters MC, Van Westen GJP, Li Q, Ijzerman AP. Importance of the extracellular loops in G protein-coupled receptors for ligand recognition and receptor activation. *Trends Pharmacol Sci*. 2011;32(1):35-42.
59. Wang S, Che T, Levit A, Shoichet BK, Wacker D, Roth BL. Structure of the D2 dopamine receptor bound to the atypical antipsychotic drug risperidone. *Nature*. 2018;555(7695):269-73.
60. Yin W, Zhou XE, Yang D, De Waal PW, Wang M, Dai A, *et al.* Crystal structure of the human 5-HT_{1B} serotonin receptor bound to an inverse agonist. *Cell Discov*. 2018;4(1):12.
61. Peng Y, McCorvy JD, Harpsøe K, Lansu K, Yuan S, Popov P, *et al.* 5-HT_{2C} Receptor Structures Reveal the Structural Basis of GPCR Polypharmacology. *Cell*. 2018;172(4):719-730.e14.

62. Plazinska A, Plazinski W, Jozwiak K. Agonist binding by the beta2-adrenergic receptor: an effect of receptor conformation on ligand association-dissociation characteristics. *Eur Biophys J*. 2015;44(3):149-63.
63. Wheatley M, Wootten D, Conner MT, Simms J, Kendrick R, Logan RT, *et al*. Lifting the lid on GPCRs: The role of extracellular loops. *Br J Pharmacol*. 2012;165(6):1688-703.
64. Wacker D, Wang S, Mccorvy JD, Shoichet BK, Dror RO, Correspondence BLR, *et al*. Crystal Structure of an LSD-Bound Human Serotonin Receptor. *Cell*. 2017;168:377-89.
65. Avlani VA, Gregory KJ, Morton CJ, Parker MW, Sexton PM, Christopoulos A. Critical role for the second extracellular loop in the binding of both orthosteric and allosteric G protein-coupled receptor ligands. *J Biol Chem*. 2007;282(35):25677-86.
66. Storjohann L, Holst B, Schwartz TW. A second disul de bridge from the N-terminal domain to extracellular loop-2 dampens receptor activity. *Biochemistry*. 2008;47(35):9198-207.
67. Wacker D, Wang C, Katritch V, Han GW, Huang X, Mccorvy JD, *et al*. Structural Features for Functional Selectivity at Serotonin Receptors. *Science*. 2013;340(6132):615-9.
68. Wingler LM, Elgeti M, Hilger D, Latorraca NR, Lerch MT, Staus DP, *et al*. Angiotensin Analogs with Divergent Bias Stabilize Distinct Receptor Conformations. *Cell*. 2019;176(3):468-478.e11.
69. Rose AS, Elgeti M, Zachariae U, Grubmüller H, Hofmann KP, Scheerer P, *et al*. Position of transmembrane helix 6 determines receptor G protein coupling specificity. *J Am Chem Soc*. 2014;136(32):11244-7.
70. Flock T, Ravarani CNJ, Sun D, Venkatakrishnan AJ, Kayikci M, Tate CG, *et al*. Universal allosteric mechanism for Gα activation by GPCRs. *Nature*. 2015;524(7564):173-9.

71. Venkatakrishnan AJ, Deupi X, Lebon G, Heydenreich FM, Flock T, Miljus T, *et al.* Diverse activation pathways in class A GPCRs converge near the G-protein-coupling region. *Nature*. 2016;536(7617):484-7.
72. Wu H, Wacker D, Mileni M, Katritch V, Han GW, Vardy E, *et al.* Structure of the human κ -opioid receptor in complex with JDTic. *Nature*. 2012;485(7398):327-32.
73. Parmar VK, Grinde E, Mazurkiewicz JE, Herrick-Davis K. Beta2-adrenergic receptor homodimers: Role of transmembrane domain 1 and helix 8 in dimerization and cell surface expression. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2017;1859(9):1445-55.
74. Gorinski N, Kowalsman N, Renner U, Wirth A, Reinartz MT, Seifert R, *et al.* Computational and experimental analysis of the transmembrane domain 4/5 dimerization interface of the serotonin 5-HT(1A) receptor. *Mol Pharmacol*. 2012;83(3):448-63.
75. Guo W, Shi L, Filizola M, Weinstein H, Javitch JA. Crosstalk in G protein-coupled receptors: changes at the transmembrane homodimer interface determine activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(48):17495-500.
76. Mancia F, Assur Z, Herman AG, Siegel R, Hendrickson WA. Ligand sensitivity in dimeric associations of the serotonin 5HT2c receptor. *EMBO Rep*. 2008;9(4):363-9.
77. Jastrzebska B, Chen Y, Orban T, Jin H, Hofmann L, Palczewski K. Disruption of rhodopsin dimerization with synthetic peptides targeting an interaction interface. *J Biol Chem*. 2015;290(42):25728-44.
78. Navarro G, Cordoní A, Casadó-Anguera V, Moreno E, Cai N-S, Cortés A, *et al.* Evidence for functional pre-coupled complexes of receptor heteromers and adenylyl cyclase. *Nat*

Commun. 2018;9(1):1242.

79. Navarro G, Cordoní A, Brugarolas M, Moreno E, Aguinaga D, Pérez-Benito L, *et al.* Cross-communication between G_i and G_s in a G-protein-coupled receptor heterotetramer guided by a receptor C-terminal domain. *BMC Biol.* 2018;16(1).
80. Han Y, Moreira IS, Urizar E, Weinstein H, Javitch JA. Allosteric communication between protomers of dopamine class A GPCR dimers modulates activation. *Nat Chem Biol.* 2009;5(9):688-95.
81. Herrick-Davis K, Grinde E, Harrigan TJ, Mazurkiewicz JE. Inhibition of serotonin 5-hydroxytryptamine_{2C} receptor function through heterodimerization: Receptor dimers bind two molecules of ligand and one G-protein. *J Biol Chem.* 2005;280(48):40144-51.
82. Brock C, Oueslati N, Phan Soler S, Boudier L, Rondard P, Pin J-P. Activation of a Dimeric Metabotropic Glutamate Receptor by Intersubunit Rearrangement. *J Biol Chem.* 2007;282(45):33000-8.
83. Vischer HF, Castro M, Pin JP. G Protein–Coupled Receptor Multimers: A Question Still Open Despite the Use of Novel Approaches. *Mol Pharmacol* *Mol Pharmacol.* 2015;88:561-71.
84. Pediani JD, Ward RJ, Godin AG, Marsango S, Milligan G. Dynamic regulation of quaternary organization of the m1 muscarinic receptor by subtype-selective antagonist drugs. *J Biol Chem.* 2016;291(25):13132-46.
85. Pellissier LP, Barthet G, Gaven F, Cassier E, Trinquet E, Pin JP, *et al.* G protein activation by serotonin type 4 receptor dimers: Evidence that turning on two protomers is more efficient. *J Biol Chem.* 2011;286(12):9985-97.
86. Corriden R, Kilpatrick LE, Kellam B, Briddon SJ, Hill SJ. Kinetic analysis of antagonist-occupied adenosine-A₃ receptors

- within membrane microdomains of individual cells provides evidence of receptor dimerization and allostherism. *FASEB J.* 2014;28(10):4211-22.
87. Springael JY, Minh PN Le, Urizar E, Costagliola S, Vassart G, Parmentier M. Allosteric modulation of binding properties between units of chemokine receptor homo- and hetero-oligomers. *Mol Pharmacol.* 2006;69(5):1652-61.
 88. Liu J, Zhang Z, Moreno-Delgado D, Dalton JA, Rovira X, Trapero A, *et al.* Allosteric control of an asymmetric transduction in a G protein-coupled receptor heterodimer. *Elife.* 2017;6:e26985.
 89. Xue L, Rovira X, Scholler P, Zhao H, Liu J, Pin J-P, *et al.* Major ligand-induced rearrangement of the heptahelical domain interface in a GPCR dimer. *Nat Chem Biol.* 2014;11(2):134-40.
 90. Pei L, Li S, Wang M, Diwan M, Anisman H, Fletcher PJ, *et al.* Uncoupling the dopamine D1-D2 receptor complex exerts antidepressant-like effects. *Nat Med.* 2010;16(12):1393-5.
 91. Hall RA. Co-immunoprecipitation as a Strategy to Evaluate Receptor-Receptor or Receptor-Protein Interactions. En: George SR, O'Dowd BF, editores. *G Protein-Coupled Receptor-Protein Interactions*. 1.^a ed. John Wiley & Sons; 2005. p. 165-78.
 92. Berthouze M, Rivail L, Lucas A, Ayoub M a., Russo O, Sicsic S, *et al.* Two transmembrane Cys residues are involved in 5-HT₄ receptor dimerization. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;356(3):642-7.
 93. Salim K, Fenton T, Bacha J, Urien-Rodriguez H, Bonnert T, Skynner H a., *et al.* Oligomerization of G-protein-coupled receptors shown by selective co-immunoprecipitation. *J Biol Chem.* 2002;277(18):15482-5.
 94. James JR, Oliveira MI, Carmo AM, Iaboni A, Davis SJ. A

- rigorous experimental framework for detecting protein oligomerization using bioluminescence resonance energy transfer. *Nat Methods*. 2006;3(12):1001-6.
95. Moutkine I, Quentin E, Guiard BP, Maroteaux L, Doly S. Heterodimers of serotonin receptor subtypes 2 are driven by 5-HT_{2C} protomers. *J Biol Chem*. 2017;292(15):6352-68.
 96. Kilpatrick LE, Briddon SJ, Holliday ND. Fluorescence correlation spectroscopy, combined with bimolecular fluorescence complementation, reveals the effects of beta-arrestin complexes and endocytic targeting on the membrane mobility of neuropeptide Y receptors. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2012;1823(6):1068-81.
 97. Kilpatrick LE, Hill SJ. The use of fluorescence correlation spectroscopy to characterize the molecular mobility of fluorescently labelled G protein-coupled receptors. *Biochem Soc Trans*. 2016;44(2):624-9.
 98. May LT, Bridge LJ, Stoddart LA, Briddon SJ, Hill SJ. Allosteric interactions across native adenosine-A₃ receptor homodimers: quantification using single-cell ligand-binding kinetics. *FASEB J*. 2011;25(10):3465-76.
 99. Herrick-Davis K, Grinde E, Cowan A, Mazurkiewicz JE. Fluorescence correlation spectroscopy analysis of serotonin, adrenergic, muscarinic, and dopamine receptor dimerization: the oligomer number puzzle. *Mol Pharmacol*. 2013;84(4):630-42.
 100. Teitler M, Klein MT. A new approach for studying GPCR dimers: drug-induced inactivation and reactivation to reveal GPCR dimer function in vitro, in primary culture, and in vivo. *Pharmacol Ther*. 2012;133(2):205-17.
 101. Iglesias A, Cimadevila M, Cadavid MI, Loza MI, Brea J. Serotonin-2A homodimers are needed for signalling via both

- phospholipase A2 and phospholipase C in transfected CHO cells. *Eur J Pharmacol.* 2017;800:63-9.
102. Daniels DJ, Lenard NR, Etienne CL, Law P-Y, Roerig SC, Portoghese PS. Opioid-induced tolerance and dependence in mice is modulated by the distance between pharmacophores in a bivalent ligand series. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(52):19208-13.
 103. Felsing DE, Anastasio NC, Miszkiel JM, Gilbertson SR, Allen JA, Cunningham KA. Biophysical validation of serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptor interaction. Vaudry H, editor. *PLoS One.* 2018;13(8):e0203137.
 104. Steel E, Murray VL, Liu AP. Multiplex Detection of Homo- and Heterodimerization of G Protein-Coupled Receptors by Proximity Biotinylation Materials and Methods Cell culture and constructs. *PLoS One.* 2014;9(4):e93646.
 105. Masson J, Emerit MB, Hamon M, Darmon M. Serotonergic signaling: Multiple effectors and pleiotropic effects. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal.* 2012;1(6):685-713.
 106. Nichols DE, Sassano MF, Halberstadt AL, Klein LM, Brandt SD, Elliott SP, *et al.* N-Benzyl-5-methoxytryptamines as Potent Serotonin 5-HT₂ Receptor Family Agonists and Comparison with a Series of Phenethylamine Analogues. *ACS Chem Neurosci.* 2015;6(7):1165-75.
 107. Toro-Sazo M, Brea J, Loza MI, Cimadevila M, Cassels BK. 5-HT₂ receptor binding, functional activity and selectivity in N-benzyltryptamines. *PLoS One.* 2019;14(1):e0209804.
 108. Azuaje J, López P, Iglesias A, De La Fuente RA, Pérez-Rubio JM, García D, *et al.* Development of Fluorescent Probes that Target Serotonin 5-HT_{2B} Receptors. *Sci Rep.* 2017;7(1).
 109. Regard JB, Sato IT, Coughlin SR. Anatomical Profiling of G Protein-Coupled Receptor Expression. *Cell.* 2008;135(3):561-

- 71.
110. Carvalho-Silva D, Pierleoni A, Pignatelli M, Ong CK, Fumis L, Karamanis N, *et al.* Open Targets Platform: New developments and updates two years on. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D1056-65.
 111. Gandhimathi A, Sowdhamini R. Molecular modelling of human 5-hydroxytryptamine receptor (5-HT_{2A}) and virtual screening studies towards the identification of agonist and antagonist molecules. *J Biomol Struct Dyn.* 2016;34(5):952-70.
 112. Almaula N, Ebersole BJ, Zhang D, Weinstein H, Sealfon S. Mapping the binding site pocket of the serotonin 5-Hydroxytryptamine_{2A} receptor. Ser3.36(159) provides a second interaction site for the protonated amine of serotonin but not of lysergic acid diethylamide or bufotenin. *J Biol Chem.* 1996;271(25):14672-5.
 113. Ebersole BJ, Visiers I, Weinstein H, Sealfon SC. Molecular basis of partial agonism: orientation of indoleamine ligands in the binding pocket of the human serotonin 5-HT_{2A} receptor determines relative efficacy. *Mol Pharmacol.* 2003;63(1):36-43.
 114. Marti-Solano M, Iglesias A, de Fabritiis G, Sanz F, Brea J, Loza MI, *et al.* Detection of New Biased Agonists for the Serotonin 5-HT_{2A} Receptor: Modeling and Experimental Validation. *Mol Pharmacol.* 2015;87(4):740-6.
 115. Kanagarajadurai K, Malini M, Bhattacharya A, Panicker MM, Sowdhamini R. Molecular modeling and docking studies of human 5-hydroxytryptamine 2A (5-HT_{2A}) receptor for the identification of hotspots for ligand binding. *Mol Biosyst.* 2009;5(12):1877-88.
 116. Perez-Aguilar JM, Shan J, Levine M V., Khelashvili G, Weinstein H. A functional selectivity mechanism at the serotonin-2A GPCR involves ligand-dependent conformations

- of intracellular loop 2. *J Am Chem Soc.* 2014;136(45):16044-54.
117. Karaki S, Becamel C, Murat S, Mannoury la Cour C, Millan MJ, Prézeau L, *et al.* Quantitative Phosphoproteomics Unravels Biased Phosphorylation of Serotonin 2A Receptor at Ser280 by Hallucinogenic versus Nonhallucinogenic Agonists. *Mol Cell Proteomics.* 2014;13(5):1273-85.
 118. Shan J, Khelashvili G, Mondal S, Mehler EL, Weinstein H. Ligand-dependent conformations and dynamics of the serotonin 5-HT(2A) receptor determine its activation and membrane-driven oligomerization properties. *PLoS Comput Biol.* 2012;8(4):e1002473.
 119. Łukasiewicz S, Faron-Górecka A, Kędracka-Krok S, Dziedzicka-Wasylewska M. Effect of clozapine on the dimerization of serotonin 5-HT2A receptor and its genetic variant 5-HT2AH425Y with dopamine D 2 receptor. *Eur J Pharmacol.* 2011;659(2-3):114-23.
 120. Davies MA, Setola V, Strachan RT, Sheffler DJ, Salay E, Hufeisen SJ, *et al.* Pharmacologic analysis of non-synonymous coding h5-HT2A SNPs reveals alterations in atypical antipsychotic and agonist efficacies. *Pharmacogenomics J.* 2006;6(1):42-51.
 121. Kimura KT, Asada H, Inoue A, Kadji FMN, Im D, Mori C, *et al.* Structures of the 5-HT2A receptor in complex with the antipsychotics risperidone and zotepine. *Nat Struct Mol Biol.* 2019;26(2):121-8.
 122. Berg KA, Stout BD, Maayani S, Clarke WP. Differences in rapid desensitization of 5-hydroxytryptamine2A and 5-hydroxytryptamine2C receptor-mediated phospholipase C activation. *Pharmacology.* 2001;299(2):593-602.
 123. Halberstadt AL. Recent advances in the

- neuropsychopharmacology of serotonergic hallucinogens. *Behav Brain Res.* 2015;277:99-120.
124. Berg KA, Maayani S, Goldfarb J, Scaramellini C, Leff P, Clarke WP. Effector pathway-dependent relative efficacy at serotonin type 2A and 2C receptors: evidence for agonist-directed trafficking of receptor stimulus. *Mol Pharmacol.* 1998;54(1):94-104.
125. Kurrasch-Orbaugh DM, Watts VJ, Barker EL, Nichols DE. Serotonin 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor-coupled phospholipase C and phospholipase A₂ signaling pathways have different receptor reserves. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;304(1):229-37.
126. Kurrasch-orbaugh DM, Watts VALJ, Barker EL, Nichols DE. Phospholipase C and Phospholipase A₂ Signaling Pathways Have Different Receptor Reserves. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;304(1):229-37.
127. Moya PR, Berg KA, Gutiérrez-Hernandez MA, Sáez-Briones P, Reyes-Parada M, Cassels BK, *et al.* Functional selectivity of hallucinogenic phenethylamine and phenylisopropylamine derivatives at human 5-hydroxytryptamine (5-HT) 2A and 5-HT_{2C} receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;321(3):1054-61.
128. Lopez-Gimenez JF, Villazon M, Brea J, Loza MI, Palacios JM, Mengod G, *et al.* Multiple Conformations of Native and Recombinant Human 5-Hydroxytryptamine_{2A} Receptors Are Labeled by Agonists and Discriminated by Antagonists. *Mol Pharmacol.* 2001;60(4):690-9.
129. Brea J, Castro M, Giraldo J, López-Giménez JF, Padín JF, Quintián F, *et al.* Evidence for Distinct Antagonist-Revealed Functional States of 5HT_{2A} Homodimers. *Mol Pharmacol.* 2009;75(6):1380-91.
130. Schmid CL, Streicher JM, Meltzer HY, Bohn LM. Clozapine

- acts as an agonist at serotonin 2A receptors to counter MK-801-induced behaviors through a β arrestin2-independent activation of akt. *Neuropsychopharmacology*. 2014;39(8):1902-13.
131. Yadav PN, Kroeze WK, Farrell MS, Roth BL. Antagonist Functional Selectivity: 5-HT 2A Serotonin Receptor Antagonists Differentially Regulate 5-HT 2A Receptor Protein Level In Vivo. *Pharmacology*. 2011;339(1):99-105.
 132. Moreno JL, Holloway T, Umali A, Rayannavar V, Sealfon SC, González-Maeso J. Persistent effects of chronic clozapine on the cellular and behavioral responses to LSD in mice.
 133. González-Maeso J, Ang RL, Yuen T, Chan P, Weisstaub N V, López-Giménez JF, *et al.* Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature*. 2008;452(7183):93-7.
 134. Raote I, Bhattacharyya S, Panicker MM. Functional Selectivity in Serotonin Receptor 2A (5-HT 2A) Endocytosis, Recycling, and Phosphorylation. *Mol Pharmacol*. 2013;83(1):42-50.
 135. González-Maeso J, Yuen T, Ebersole BJ, Wurmbach E, Lira A, Zhou M, *et al.* Transcriptome fingerprints distinguish hallucinogenic and nonhallucinogenic 5-hydroxytryptamine 2A receptor agonist effects in mouse somatosensory cortex. *J Neurosci*. 2003;23(26):8836-43.
 136. Tournais C, Mutel V, Manivet P, Launay J, Kellermann O. Cross-talk between 5-hydroxytryptamine receptors in a serotonergic cell line. Involvement of arachidonic acid metabolism. *Biochemistry*. 1998;273(28):17498-503.
 137. Lopez-Gimenez JF, Vilaró MT, Milligan G. Morphine Desensitization, Internalization, and Down-Regulation of the μ Opioid Receptor Is Facilitated by Serotonin 5-Hydroxytryptamine 2A Receptor Coactivation. *Mol Pharmacol*. 2008;74(5):1278-91.

138. Teitler M, Toohey N, Knight JA, Klein MT, Smith C. Clozapine and other competitive antagonists reactivate risperidone- inactivated h5-HT₇ receptors: Radioligand binding and functional evidence for GPCR homodimer protomer interactions. *Psychopharmacology (Berl)*. 2010;212(4):687-97.
139. Smith C, Toohey N, Knight JA, Klein MT, Teitler M. Risperidone-Induced Inactivation and Clozapine-Induced Reactivation of Rat Cortical Astrocyte 5-Hydroxytryptamine₇ Receptors: Evidence for In Situ G Protein-Coupled Receptor Homodimer Protomer Cross-Talk. *Mol Pharmacol*. 2011;79(2):318-25.
140. Bruno A, Beato C, Costantino G. Molecular dynamics simulations and docking studies on 3D models of the heterodimeric and homodimeric 5-HT_{2A} receptor subtype. *Futur Med Chem*. 2011;3(6):665-81.
141. Soto CA, Shashack MJ, Fox RG, Bubar MJ, Rice KC, Watson CS, *et al*. Novel Bivalent 5-HT_{2A} Receptor Antagonists Exhibit High Affinity and Potency in Vitro and Efficacy in Vivo. *ACS Chem Neurosci*. 2018;9(3):514-21.
142. Albizu L, Holloway T, González-Maeso J, Sealfon SC. Functional crosstalk and heteromerization of serotonin 5-HT_{2A} and dopamine D₂ receptors. *Neuropharmacology*. 2011;61(4):770-7.
143. Moreno JL, Miranda-Azpiazu P, García-Bea A, Younkin J, Cui M, Kozlenkov A, *et al*. Allosteric signaling through an mGlu₂ and 5-HT_{2A} heteromeric receptor complex and its potential contribution to schizophrenia. *Sci Signal*. 2016;9(410):ra5.
144. Moreno JL, Muguruza C, Umali A, Mortillo S, Holloway T, Pilar-Cuellar F, *et al*. Identification of three residues essential for 5-hydroxytryptamine 2A-metabotropic glutamate 2 (5-HT_{2A}-mGlu₂) receptor heteromerization and its psychoactive behavioral function. *J Biol Chem*. 2012;287(53):44301-19.

145. Borroto-Escuela DO, Li X, Tarakanov AO, Savelli D, Narváez M, Shumilov K, *et al.* Existence of Brain 5-HT_{1A}–5-HT_{2A} Isoreceptor Complexes with Antagonistic Allosteric Receptor–Receptor Interactions Regulating 5-HT_{1A} Receptor Recognition. *ACS Omega*. 2017;2(8):4779-89.
146. Viñals X, Moreno E, Lanfumey L, Cordoní A, Pastor A, De La Torre R, *et al.* Cognitive impairment induced by delta9-tetrahydrocannabinol occurs through heteromers between cannabinoid CB₁ and serotonin 5-HT_{2A} receptors. *PLoS Biol*. 2015;13(7):e1002194.
147. Bateman A. UniProt: A worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D506-15.
148. Mozumder S, Bej A, Srinivasan K, Mukherjee S, Sengupta J. Comprehensive structural modeling and preparation of human 5-HT_{2A} G-protein coupled receptor in functionally active form. *Biopolymers*. 2019;e23329.
149. Zhang Q, Zhou M, Zhao L, Jiang H, Yang H. Dynamic States of the Ligand-Free Class A G Protein-Coupled Receptor Extracellular Side. *Biochemistry*. 2018;57(32):4767-75.
150. Iglesias A, Cimadevila M, la Fuente RA de, Martí-Solano M, Cadavid MI, Castro M, *et al.* Serotonin 2A receptor disulfide bridge integrity is crucial for ligand binding to different signalling states but not for its homodimerization. *Eur J Pharmacol*. 2017;815:138-46.
151. Soave M, Cseke G, Hutchings CJ, Brown AJH, Woolard J, Hill SJ. A monoclonal antibody raised against a thermo-stabilised β 1 -adrenoceptor interacts with extracellular loop 2 and acts as a negative allosteric modulator of a sub-set of β 1 -adrenoceptors expressed in stable cell lines. *Biochem Pharmacol*. 2018;147:38-54.
152. Rummel PC, Thiele S, Hansen LS, Petersen TP, Sparre-Ulrich

- AH, Ulven T, *et al.* Extracellular disulfide bridges serve different purposes in two homologous chemokine receptors, CCR1 and CCR5. *Mol Pharmacol.* 2013;84(3):335-45.
153. Scholl DJ, Wells JN. Serine and alanine mutagenesis of the nine native cysteine residues of the human A1 adenosine receptor. *Biochem Pharmacol.* 2000;60(11):1647-54.
154. Naranjo AN, Chevalier A, Cousins GD, Ayettey E, McCusker EC, Wenk C, *et al.* Conserved disulfide bond is not essential for the adenosine A2A receptor: Extracellular cysteines influence receptor distribution within the cell and ligand-binding recognition. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2015;1848(2):603-14.
155. Lucaites VL, Nelson DL, Wainscott DB, Baez M. Receptor subtype and density determine the coupling repertoire of the 5-HT2 receptor subfamily. *Life Sci.* 1996;59(13):1081-95.
156. Forutan F, Estalji S, Beu M, Nikolaus S, Hamacher K, Coenen HH, *et al.* Distribution of 5HT2A receptors in the human brain: comparison of data in vivo and post mortem. *Nuklearmedizin.* 2002;41(4):197-201.
157. Ward RJ, Alvarez-Curto E, Milligan G. Using the Flp-InTM T-RexTM System to Regulate GPCR Expression. En: *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2011. p. 21-37.
158. Flanagan CA. GPCR-radioligand binding assays. *Methods Cell Biol.* 2016;132:191-215.
159. Martins SA, Trabuco JR, Monteiro GA, Chu V, Conde JP, Prazeres MMF. Towards the miniaturization of GPCR-based live-cell screening assays. *Trends Biotechnol.* 2012;30(11):566-74.
160. Bylund DB, Toews ML. Radioligand binding methods: practical guide and tips. *Am J Physiol Cell Mol Physiol.* noviembre de 1993;265(5):L421-9.

161. Vauquelin G, Van Liefde I, Swinney DC. Radioligand binding to intact cells as a tool for extended drug screening in a representative physiological context. *Drug Discov Today Technol.* 1 de octubre de 2015;17:28-34.
162. Liu K, Southall N, Titus SA, Inglese J, Eskay RL, Shinn P, *et al.* A Multiplex Calcium Assay for Identification of GPCR Agonists and Antagonists. *Assay Drug Dev Technol.* 2010;8(3):362-74.
163. Leyton-Puig D, Kedziora KM, Isogai T, van den Broek B, Jalink K, Innocenti M. PFA fixation enables artifact-free super-resolution imaging of the actin cytoskeleton and associated proteins. *Biol Open.* 2016;5(7):1001-9.
164. Knauer CS, Campbell JE, Chio CL FL. Pharmacological characterization of mitogen-activated protein kinase activation by recombinant human 5-HT_{2C}, 5-HT_{2A}, and 5-HT_{2B} receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2009;379(5):461-71.
165. Kaler G, Otto M, Okun A, Okun I. Serotonin Antagonist Profiling on 5HT_{2A} and 5HT_{2C} Receptors by Nonequilibrium Intracellular Calcium Response Using an Automated Flow-Through Fluorescence Analysis System, HT-PS(R)0, HT-PS(R)0. *J Biomol Screen.* 2002;7(3):291-301.
166. Abdel S, Aly R, Hossain M, Bhuiyan MA, Nakamura T, Nagatomo T. Assessment of Binding Affinity to 5-Hydroxytryptamine 2A (5-HT_{2A}) Receptor and Inverse Agonist Activity of Naftidrofuryl: Comparison With Those of Sarpogrelate. *J Pharmacol Sci J Pharmacol Sci.* 2009;110:4.
167. Kroeze WK, Hufeisen SJ, Popadak BA, Renock SM, Steinberg S, Ernsberger P, *et al.* H₁-histamine receptor affinity predicts short-term weight gain for typical and atypical antipsychotic drugs. *Neuropsychopharmacology.* 2003;28(3):519-26.

168. Schindler E a D, Dave KD, Smolock EM, Aloyo VJ, Harvey J a. Serotonergic and dopaminergic distinctions in the behavioral pharmacology of (\pm)-1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane (DOI) and lysergic acid diethylamide (LSD). *Pharmacol Biochem Behav.* 2012;101(1):69-76.
169. De Courcelles DDC, Leysen JE, Roevens P, van Belle H. The serotonin-S2 Receptor: A receptor-transducer coupling model to explain insurmountable antagonist effects. *Drug Dev Res.* 1986;8(1-4):173-8.
170. Guo D, Hillger JM, IJzerman AP, Heitman LH. Drug-Target Residence Time-A Case for G Protein-Coupled Receptors. *Med Res Rev.* 2014;34(4):856-92.
171. Schuetz DA, de Witte WEA, Wong YC, Knasmueller B, Richter L, Kokh DB, *et al.* Kinetics for Drug Discovery: an industry-driven effort to target drug residence time. *Drug Discov Today.* 2017;22(6):896-911.
172. Vauquelin G, Charlton SJ. Exploring avidity: Understanding the potential gains in functional affinity and target residence time of bivalent and heterobivalent ligands. *Br J Pharmacol.* 2012;168(8):1771-85.
173. Langlois X, Megens A, Lavreysen H, Atack J, Cik M, te Riele P, *et al.* Pharmacology of JNJ-37822681, a specific and fast-dissociating D2 antagonist for the treatment of schizophrenia. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;342(1):91-105.
174. Feng Y, Saad Y, Karnik S. Reversible inactivation of AT 2 angiotensin II receptor from cysteine–disulfide bond exchange. *FEBS Lett.* 2000;484(2000):133-8.
175. Čarman-Kržan M. The effect of group selective reagentsN-ethylmaleimide and dithiothreitol on histamine H1-receptor binding sites in the vascular smooth muscle membranes. *Agents Actions.* 1984;14(3-4):561-5.

176. Fay JF, Farrens DL. A key agonist-induced conformational change in the cannabinoid receptor CB1 is blocked by the allosteric ligand Org 27569. *J Biol Chem*. 2012;287(40):33873-82.
177. Nénonéné EK, Radja F, Carli M, van Gelder NM, Afkhami-Dastjerdian S, Reader TA. Alkylation of [3H]8-OH-DPAT binding sites in rat cerebral cortex and hippocampus. *Neurochem Res*. 1996;21(2):167-76.
178. Blough BE, Landavazo A, Decker AM, Partilla JS, Baumann MH, Rothman RB. Interaction of psychoactive tryptamines with biogenic amine transporters and serotonin receptor subtypes. *Psychopharmacology (Berl)*. 2014;231(21):4135-44.
179. Kurrasch-orbaugh DM, Watts VALJ, Barker EL, Nichols DE. Phospholipase C and Phospholipase A 2 Signaling Pathways Have Different Receptor Reserves. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;304(1):229-37.
180. Cussac D, Boutet-Robinet E, Ailhaud M-C, Newman-Tancredi A, Martel J-C, Danty N, *et al*. Agonist-directed trafficking of signalling at serotonin 5-HT2A, 5-HT2B and 5-HT2C-VSV receptors mediated Gq/11 activation and calcium mobilisation in CHO cells. *Eur J Pharmacol*. 2008;594(1-3):32-8.
181. De Filippo E, Namasivayam V, Zappe L, El-Tayeb A, Schiedel AC, Müller CE. Role of extracellular cysteine residues in the adenosine A2A receptor. *Purinergic Signal*. 2016;12(2):313-29.
182. Seitz PK, Bremer NM, McGinnis AG, Cunningham K a, Watson CS. Quantitative changes in intracellular calcium and extracellular-regulated kinase activation measured in parallel in CHO cells stably expressing serotonin (5-HT) 5-HT2A or 5-HT2C receptors. *BMC Neurosci*. 2012;13(1):25.
183. Li X, Llorente I, Brasch M. Improvements in live cell analysis of G protein coupled receptors using second generation BD

- calcium assay kits. *Curr Chem Genomics*. 2008;2:10-5.
184. Harvey J a., Welsh SE, Hood H, Romano a. G. Effect of 5-HT₂ receptor antagonists on a cranial nerve reflex in the rabbit: evidence for inverse agonism. *Psychopharmacology (Berl)*. 1999;141(2):162-8.
 185. Fay JF, Farrens DL. The Membrane Proximal Region of the Cannabinoid Receptor. *Biochemistry*. 2013;52(46):8286-94.
 186. Gómez Fernández S, Loza MI, Brea J. Estudio de la influencia del heterodímero de los receptores de dopamina D2 y 5-HT_{2A} de serotonina. Aplicación a la farmacoterapia antipsicótica. Universidad de Santiago de Compostela; 2017.
 187. Hagan JJ, Price GW, Jeffrey P, Deeks NJ, Stean T, Piper D, *et al*. Characterization of SB-269970-A, a selective 5-HT₇ receptor antagonist. *Br J Pharmacol*. 2000;130(3):539-48.
 188. Ragnarsson L, Andersson Å, Thomas WG, Lewis RJ. Extracellular surface residues of the α 1B-adrenoceptor critical for G protein-coupled receptor function. *Mol Pharmacol*. 2015;87(1):121-9.
 189. Feng YH, Karnik SS. Role of Transmembrane Helix IV in G-protein Specificity of the Angiotensin II Type 1 Receptor. *J Biol Chem*. 1999;274(50):35546-52.
 190. Eggers AE. Extending David Horrobin's membrane phospholipid theory of schizophrenia: Overactivity of cytosolic phospholipase A2 in the brain is caused by overdrive of coupled serotonergic 5HT_{2A/2C} receptors in response to stress. *Med Hypotheses*. 2012;79(6):740-3.
 191. Zeng FY, Soldner A, Schöneberg T, Wess J. Conserved extracellular cysteine pair in the M3 muscarinic acetylcholine receptor is essential for proper receptor cell surface localization but not for G protein coupling. *J Neurochem*. 1999;72(6):2404-14.

192. Woolley MJ, Watkins HA, Taddese B, Karakullukcu ZG, Barwell J, Smith KJ, *et al.* The role of ECL2 in CGRP receptor activation: A combined modelling and experimental approach. *J R Soc Interface.* 2013;10(88).
193. Nguyen ATN, Baltos J-A, Thomas T, Nguyen TD, Muñoz LL, Gregory KJ, *et al.* Extracellular Loop 2 of the Adenosine A1 Receptor Has a Key Role in Orthosteric Ligand Affinity and Agonist Efficacy. *Mol Pharmacol.* 2016;90(6):703-14.
194. Cook JVF, Eidne KA. An intramolecular disulfide bond between conserved extracellular cysteines in the gonadotropin-releasing hormone receptor is essential for binding and activation. *Endocrinology.* 1997;138(7):2800-6.
195. Ellgaard L, Sevier CS, Bulleid NJ. How Are Proteins Reduced in the Endoplasmic Reticulum? *Trends Biochem Sci.* 2018;43(1):32-43.
196. Araki K, Nagata K. Protein folding and quality control in the ER. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(11):a007526.
197. Guan R, Wu X, Feng X, Zhang M, Hébert TE, Segaloff DL. Structural determinants underlying constitutive dimerization of unoccupied human follitropin receptors. *Cell Signal.* 2010;22(2):247-56.
198. Zeng F-Y, Wess J. Molecular Aspects of Muscarinic Receptor Dimerization. *Neuropsychopharmacology.* 2000;23(4 Suppl):S19-31.
199. Glukhova A, Thal DM, Nguyen AT, Vecchio EA, Jörg M, Scammells PJ, *et al.* Structure of the Adenosine A1 Receptor Reveals the Basis for Subtype Selectivity. *Cell.* 2017;168(5):867-877.e13.
200. Kaczor AA, Makarska-Bialokoz M, Selent J, de la Fuente RA, Martí-Solano M, Castro M. Application of BRET for studying G protein-coupled receptors. *Mini Rev Med Chem.* mayo de

2014;14(5):411-25.

201. Ayoub MA, Pflieger KD. Recent advances in bioluminescence resonance energy transfer technologies to study GPCR heteromerization. *Curr Opin Pharmacol*. 2010;10(1):44-52.
202. Romano C, Sesma M a, McDonald CT, O'Malley K, Van den Pol a N, Olney JW. Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR5 immunoreactivity in rat brain. *J Comp Neurol*. 1995;355(3):455-69.
203. Bai M, Trivedi S, Brown EM. Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK293 cells. *J Biol Chem*. 1998;273(36):23605-10.
204. Michineau S, Alhenc-Gelas F, Rajerison RM. Human bradykinin B2 receptor sialylation and N-glycosylation participate with disulfide bonding in surface receptor dimerization. *Biochemistry*. 2006;45(8):2699-707.
205. Laroche G, Lépine MC, Thériault C, Giguère P, Giguère V, Gallant M a., *et al*. Oligomerization of the α and β isoforms of the thromboxane A2 receptor: Relevance to receptor signaling and endocytosis. *Cell Signal*. 2005;17(11):1373-83.
206. Xie Z, Lee SP, O'Dowd BF, George SR. Serotonin 5-HT(1B) and 5-HT(1D) receptors form homodimers when expressed alone and heterodimers when co-expressed. *FEBS Lett*. 1999;456(1):63-7.